

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

MÁRIO JOSÉ DE OLIVEIRA NETO

**ANÁLISE DE REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETS),
AUTOFAGIA E APOPTOSE DESENCADEADOS POR VÍRUS ZIKA**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2019**

MÁRIO JOSÉ DE OLIVEIRA NETO

**ANÁLISE DE REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETS),
AUTOFAGIA E APOPTOSE DESENCADEADOS POR VÍRUS ZIKA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula

Coorientador: Roberto Sousa Dias

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

O48a
2019

Oliveira Neto, Mário José de, 1989-

Análise de redes extracelulares de neutrófilos (NETs),
autofagia e apoptose desencadeados por vírus zika / Mário José
de Oliveira Neto. – Viçosa, MG, 2019.

58 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 49-58.

1. Vírus da Zika. 2. Neutrófilos. 3. Autofagia. 4. Apoptose.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia

CDD 22. ed. 614.5885

MÁRIO JOSÉ DE OLIVEIRA NETO

**ANÁLISE DE REDES EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETS),
AUTOFAGIA E APOPTOSE DESENCADEADOS POR VÍRUS ZIKA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 21 de outubro de 2019

Assentimento:



Mário José de Oliveira Neto
Autor



Sergio Oliveira de Paula
Orientador

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos muitos parceiros que auxiliaram no projeto até aqui. A Universidade Federal de Viçosa e CAPES, O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, além do Núcleo de Microscopia de Bioanálise.

Aos esforços do meu laboratório LIMV e do meu orientador Sergio de Paula em propiciar a mim a responsabilidade pela execução desse projeto com a compra de reagentes. Roberto Dias pelos conselhos, aquisição de reagentes pelas parcerias dele e o tempo disponibilizado para a confecção das pranchas.

A equipe da cultura celular por me ajudar na titulação e passagens dos vírus.

A equipe do laboratório de glicobiologia Professores Eduardo Almeida e Leandro Licursi e aqueles que doaram sangue para esse projeto e aqueles que não pouparam seu tempo, esforço, e dedicação e tiveram grande paciência na orientação, para as mais de 30 coletas de sangue, cálculos matemáticos de conversões, muitas horas na citometria de fluxo, e propiciaram um ambiente saudável e descontraído para que eu não desistisse. Ao meu amigo Patrick pelos conselhos, auxílio na purificação de sangue que é base para esse projeto.

A equipe do Professor Gustavo Martins pelo auxílio, orientação, e paciência na execução correta dos protocolos de imuno fluorescência, em especial ao Renan Araújo e ao Kenner Moraes Fernandez pela disponibilidade de tempo e paciência em garantir a melhoria das imagens e das lâminas, e no auxílio do uso do microscópio confocal.

A equipe do Professor Gustavo Bressan e da Professora Juliana Fieto pela pronta disponibilidade em ceder o laboratório para a execução do western blotting, e auxiliar no uso do leitor spectramax do DBQ, e do microscópio EvosFL em especial ao Thiago Souza Onofre que auxiliou na leitura das placas no spectramax em horários alternativos, e Raoni Cerqueira que não desistiu em auxiliar na executar dos protocolos do WB mesmo após três tentativas, e ao Victor Ferraz pelo tempo e dedicação para manter o laboratório aberto para o uso do microscópio EvosFL e auxiliar na captura das imagens mesmo passando das 19 horas, respeitando as horas necessárias para a visualização das NETs.

Gostaria agradecer a equipe da Professora Silvia Pompolo e Gisele Amaro pela disponibilidade do microscópio BX50 para a confecção das pranchas, e da equipe do Beagle chefiado pelo professor do DBA Jorge Dergan e seu aluno de pós doutorado Bruno Edésio por ceder o laboratório o uso do microscópio BX53.

RESUMO

OLIVEIRA NETO, Mário José, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2019. **Análise de redes extracelulares de neutrófilos (NETs), autofagia e apoptose desencadeados por vírus Zika.** Orientador: Sergio Oliveira de Paula. Coorientador: Roberto Sousa Dias.

O vírus Zika (ZIKV) apresenta tendência de migrações para órgãos imuno privilegiados no qual tem a capacidade de se replicar e gerar doenças graves. O vírus nesses locais, sem a presença de neutrófilos, se replica e ativa vias de escape. A imunidade inata atua em resposta às doenças virais pela formação de redes extracelulares de neutrófilos (NETs) que usam as vias de autofagia para promover a destruição de vírus impedindo o escape viral por meio da apoptose. O objetivo desse trabalho foi mostrar a ação das redes extracelulares de neutrófilos em vírus Zika, avaliando se as mesmas são capazes de ativar as vias estresse oxidativo e autofagia necessária para a ativação e destruição viral e se apoptose interfere nesse processo. Foram coletados neutrófilos de nove doadores saudáveis, purificados e avaliados por imuno marcação, FACS (Citometria de fluxo), leitor de fluorescência para avaliar a presença de NETs, autofagia, estresse e vias de sinalização, e apoptose estimulados pelo vírus Zika ou não. Os resultados mostraram que ocorre formação de NETs pela formação de estruturas visíveis ao microscópio, com a presença de autofagia. A quantificação de estresse oxidativo e peroxidase também confirma a ocorrência de NETs *ex vivo* induzidas por ZIKV em neutrófilos humanos, e a sinalização de duas horas das proteínas p-ERK e p-AKT mostram que não ocorre escape viral. A via de apoptose foi observada apenas de forma basal no grupo controle e no grupo que recebeu ZIKV o que indica que não ocorre escape viral em neutrófilos. O presente estudo demonstra que em neutrófilos existe um eficiente sistema de resposta ao vírus, e pode-se concluir que o vírus zika estimula os neutrófilos a ativarem as vias de estresse, autofagia, e de NETs, pela sinalização p-Erk e que não ocorre vias de escape viral em neutrófilos humanos infectados com ZIKV.

Palavras-chave: Zika. NETs (redes extracelulares de neutrófilos). Autofagia. Apoptose.

ABSTRACT

OLIVEIRA NETO, Mário José, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October 2019. **Analysis of neutrophil extracellular traps (NETs), autophagy and apoptosis triggered by Zika vírus.** Adviser: Sergio Oliveira de Paula. Co-adviser: Roberto Sousa Dias.

The zika virus (ZIKV) shows a tendency for migrations to immune-privileged sites, in which it has the capacity to replicate and generate serious diseases. The virus in these sites without the presence of neutrophils replicates and activates escape routes. Innate immunity presents a described form to combat viral diseases by the formation of neutrophil extracellular Traps (NETs) that use the autophagy pathways to promote the destruction of viruses by preventing viral escape through apoptosis. The aim of this work was to show the action of neutrophil extracellular Traps, evaluating if they are capable of activating the oxidative stress and autophagy pathways necessary for viral activation and destruction and if apoptosis interferes with this process. Neutrophils were collected from nine healthy donors, purified and evaluated by Immunofluorescence, FACS, fluorescence reader to evaluate the presence of NETs, autophagy, stress and signaling pathways, and apoptosis. The results showed that NETs occur through the formation of microscopically visible structures; histone H4 acetylated Immunofluorescence and DNA webs with the presence of viral protein, and these pathways present LC3 A / B marking thus occurring together with autophagy. The quantification of oxidative stress and peroxidase also confirms the occurrence of *ex vivo* NETs induced by zika on human neutrophils, and the 2-hour signaling of the p-ERK and p-AKT proteins show that no viral escape occurs. The apoptosis pathway was observed only at baseline in the control group and in the ZIKV group, which indicates that there is no viral escape in neutrophils. Previous research shows that for the occurrence of symptoms generated by ZIKV, migration to immune-privileged sites, stress suppression, and p-erk and p-AKT pathways in monocytes or precursors of neurons is necessary. The present study shows that in neutrophils there is a virus-fighting efficiency system, and we can conclude that zika virus stimulates neutrophils to activate the stress pathways, autophagy, and NETs, by p-Erk signaling and that there is no viral escape pathway in human neutrophils infected with ZIKV.

Keywords: Zika. Neutrophils extracellular traps. Autophagy. Apoptosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Caracterização do ZikV, envelopado, RNA polaridade ss + não segmentado, simetria icosaédrica, que apresenta uma poliproteína que é clivada em proteína E, pré-M clivada por furinas, e proteínas não estruturais NS1, e demais proteínas imunogênicas envolvidas no escape, e NS5 polimerase. 14

Figura 2 - Vias das NETs nuclear (lítica ou netose) e mitocondrial (não lítica, vital). 17

Figura 3 - vias ativadas pela rota nox2 ROS, MEK/ERK, NE elastase neutrofílica, MPO mieloperoxidase, histonas H3/4 citrulinada, ou via ativada pela SOD, mitoROS, canais SK3, AKT. Os passos finais da integração envolvem a ativação do complexo azuroma (MPO, NE, Catepsina G (CG) e do fator PAD4 que culmina com a mobilização do citoesqueleto de actina e a liberação de histonas citrulinadas. A via também é ativada ou inibida pela autofagia, pela via das PI3K/AKT/mTOR 18

Figura 4 - Integração das vias de NETs, autofagia e apoptose: o PMA estimula as NETs pela ação da NADPoxidase 2 (Nox2) e o escape, caso a apoptose seja ativada inibindo o estresse oxidativo. O DPI é mostrado como um inibidor da rota do estresse pela inibição da Nox2 e das NETs geradas por ROS, e como um indutor da autofagia. O inibidor da autofagia wortmannin inibe toda a cascata pois atua nos receptores comuns da indução das NETs e autofagia pelo PMA. A seta com X sob inibidor, indica inibição do inibidor da apoptose, e a consequente ativação da apoptose. 25

Figura 5 - Vias de integração da apoptose, que ocorre mediante a dano mitocondrial (alarminas), estresse oxidativo (ROS), exposição da fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática (alarminas) e clivagem da caspase 3 (marcador final das vias convergentes das caspases). Também é mostrado que a mitocôndria danificada pode desencadear a formação de autofagolisossomos desencadeando a apoptose ou autofagia de forma independente das caspases. 26

Figura 6 - Análise de estresse oxidativo em monócitos submetidos ao vírus Dengue, demonstrando o vírus escapando da morte (gerada pela apoptose conforme o caminho d) que seria ativada por *ros* (através de *NF-KappaBeta* nos caminhos *b* e *c*) através da expressão do *Nrf2* (caminho das letras *e,f*) que atua no sistema antioxidante da célula, inibindo o complexo NADPH oxidase composto pelas proteínas p47, p40, p67, p22 (mostradas em *a*). 27

Figura 7 - Etapas de formação da autofagia e fatores envolvidos. Nesse esquema é mostrada a via PI3K na indução, a etapa de alongação promovida pelas MAP1LC3-I/II e os ATGs, e a etapa de maturação e formação dos autofagolisossomo. A autofagia regula diferentes fases do sistema imunológico desde a hematopoese na medula, fagocitose, apoptose, apresentação de antígenos pelas APCs, produção de citocinas e inflamação e morte celular. 29

Figura 8 - Imunofluorescência dos marcadores específicos de NETs figura A merge, os ZIKV foram visualizados na teia das NETs pela detecção da proteína E viral figura B (FITC), histona H4 acetilada (TRITC) figura C, em D DAPI, em E observamos o controle negativo merge na figura E, em F observamos ausência de marcação da proteína E (FITC) e em F, a presença de marcação da histona H4 (TRICT) dentro do neutrófilo, em G e H DAPI.37

Figura 9 - Correlação NETs e autofagia por Imunofluorescência dos marcadores específicos figura A, proteína E (FITC) na teia das NETs figura B, autofagia marcada pela MAPLC3-A/B (TRITC) figura C, e dapi (DNA) figura D, controle negativo meio figura E ausência de NETs, figura F ausência de marcação da proteína E (FITC), figura G ausência de marcação para autofagia (TRITC) e ausência de NETs no dapi figura H.38

Figura 10 - Estresse oxidativo e sinalização foram medidos por FACS, pela oxidação da DCFDA (ROS total) pela comparação dos tubos contendo Zika ($P < 0,05$) e com os controles sobrenadante de cultura celular SCC e indutores Zymosan ou peróxido de hidrogênio figura A e B separadas por ANOVA e teste de Tukey. A figura 10A mostra que a oxidação da DCFDA, ou seja, o estresse gerado pelos tubos com Zika é menor do que o peróxido ($*** P < 0,001$) (10a) e maior que o controle negativo SCC (#) em neutrófilos. A atividade da peroxidase foi maior com a estimulação de MOI 10 do zika em relação ao controle SCC e em neutrófilos (figura 10B), mesmo adicionado DPI (inibidor da NADPoxidase).39

Figura 11 - Os resultados foram semelhantes à proteína pERK associada ao estresse oxidativo e ativação das vias de NETs na (figura 11A), zika ($p < 0,05$) se comparada ao controle negativo e à CAD. A outra via pAKT também foi ativada junto com a via da pERK (figura 11B) em duas horas de estimulação pelo zika se comparado ao controle negativo. Com quatro horas, a estimulação das vias é maior apenas em relação ao CAD (#) (figura 11C).40

Figura 12 - Imunomarcção de proteína de apoptose por Imunofluorescência dos marcadores específicos figura A merge (B, C e D), a proteína E do ZIKV (FITC) figura B, apoptose marcada pela Caspase 3 clivada (TRITC) figura C, em 12D DAPI, em E é mostrado o controle negativo em merge das figuras F, 4G e 4H, em F a ausência de marcação da proteína E (FITC) e em G, a presença de marcação de apoptose também no controle (TRITC), e H dapi DNA.41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Redes Extracelulares de Neutrófilos (NET)	11
1.2	Vírus Zika (ZIKV)	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
3	JUSTIFICATIVA	21
3.1	NETs e Vírus.....	23
3.2	Doenças agravadas pelas NETs.....	24
3.3	Controle e contenção das NETs	24
3.4	NETs em doenças causadas por <i>Flavivirus</i>	28
3.5	NETs em Zika	28
3.6	Autofagia.....	28
4	OBJETIVO	31
4.1	Objetivo Geral:.....	31
4.2	Objetivos Específicos:.....	31
5	MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1	Cepas Virais.....	33
5.2	Purificação de neutrófilos.....	33
5.3	Microscopia de epifluorescência	33
5.4	Imunomarcção para elastase, histona e vírus.....	34
5.5	Ensaio de ROS	34
5.6	Quantificação do DNA extracelular	34
5.7	Caspase 3 clivada na apoptose	35
5.8	Ensaio de sinalização	35
6	RESULTADOS	37
6.1	Visualização de NETs.....	37

6.2	Visualização de NETs e Autofagia.....	38
6.3	Correlação NET produção de ROS, e sinalização pERK e pAKT.....	39
6.4	Análise de apoptose.	41
7	DISCUSSÃO	43
8	CONCLUSÃO	47
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 Redes Extracelulares de Neutrófilos (NET)

A resposta dos neutrófilos à presença de patógenos se dá por degranulação, fagocitose, geração de espécies reativas de oxigênio ou formação de redes extracelulares de neutrófilos NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*) (BRINKMANN et al., 2004; FIDELES et al., 2015). Este último é efetivo para captura e destruição do vírus HIV *in vitro* (Saitoh et al., 2012), dos vírus H1N1, poxvirus *in vivo* (Narasaraju et al., 2011; Jenne et al., 2013) e dengue, podendo estar associado ao agravamento da inflamação em crianças com bronquite aguda causada pelo Vírus Sincial Respiratório (RSV) (Funchal et al., 2015) e na manifestação mais severa da febre do dengue (OPASAWATCHAI et al., 2019). Foi evidenciado que por ação das NETs os vírus podem ser eliminados, sendo descrito o mecanismo envolvendo a NADPH oxidase, com consequente liberação de espécies reativas de oxigênio (JENNE et al., 2013b).

A formação das NETs inicia-se por estímulos que ativam vias AKT/mTOR (Proteína Cinase B/“Mammalian Target of Rapamycin”) e/ou ERK (cinases reguladas por sinal extracelulares), e a propagação dos mesmos, em que os neutrófilos perdem a integridade do envelope nuclear e se ativa a participação das histonas, que são hipercitrulinadas para aumentar sua ação destrutiva sobre patógenos (FUCHS et al., 2007; PAPAYANNOPOULOS, 2017a). Posteriormente, ocorre a perda da integridade dos grânulos da serino protease elastase neutrofílica (NE) e da mieloperoxidase (MPO), o que permite a mistura dos componentes citoplasmáticos com os nucleares e com os conteúdos dos grânulos (PAPAYANNOPOULOS et al., 2010). Finalmente, as NETs emergem das células através da membrana plasmática guiadas pelo citoesqueleto de actina (PAPAYANNOPOULOS; ZYCHLINSKY, 2009).

Hakkim e colaboradores (2011) demonstraram que os neutrófilos humanos liberam as NETs em resposta ao PMA (Phorbol-12-miristato13-acetato) e produzem ROS (espécies reativas de oxigênio) de uma maneira dependente de NADPH oxidase. A rota segue a via da proteína cinase C (PKC) que culmina com a fosforilação por meio das cinases Raf/MEK/ERK. Essa via é dependente da formação do superóxido e é a principal rota da liberação das NETs. Os inibidores de ERK1/2 e p38 não afetam a geração de superóxido, sugerindo que essas proteínas estão em uma etapa posterior à formação do superóxido (via SOD2). A ação da Nox2 é impedida por

Difenileno-iodônio (DPI) ou pelo seu análogo Difenil-iodônio (DIP), o qual irá inibir a formação das NETs somente pela via NOX dependente, mas não afetará a outras vias, o que sugere que a via da SOD2 é independente. Outros compostos bloqueadores das vias da Raf-ERK-MAP cinase também inibem as NETs, como o GW5074, inibidor da c-Raf cinase, e o U0126 inibidor da MEK (HAKKIM et al., 2011).

Outras proteínas, de outras rotas como GTPase da família Rho, a RAC2 (família GTPases da família Rho, substrato 2 da toxina botulínica C3 relacionada com Ras) e a AKT também participam e atuam em outras vias como a da autofagia (GALLUZZI et al., 2012). A via de sinalização da AKT quando inibida pelo XI (AKT-inibidor) deflagra a apoptose, e pode ser uma maneira de conter os vírus que escapam das redes por meio da inibição do estresse (DOUDA et al., 2014). A participação da AKT e das proteínas da autofagia nas NETs ainda não foi completamente esclarecida. O que se sabe é que a autofagia é comumente associada às NETs, seja por um processo de controle da via para não gerar alarminas, ou seja por meio dos autofagolisossomos, componentes cruciais para a ação do complexo azuroma em destruir os patógenos sem gerar inflamação (PAPAYANNOPOULOS, 2017; REMIJSEN et al., 2011). A quantificação desses autofagolisossomos é feita por meio de anticorpos MAPLC3A/B, sonda inibidora do tráfego celular que marca organela ácida (MDC) ou sonda marcadora de lisossomos ácidos lysotracker (BARTH; GLICK; MACLEOD, 2010; KLIONSKY et al., 2016).

Na geração das NETs, os neutrófilos geralmente morrem, contudo, em alguns casos, eles se mantêm vivos quando estimulados e podem produzir NETs sem que haja a netose (morte celular devido à formação das NETs), liberando DNA mitocondrial ou apenas de uma das lobulações. Esse processo seria uma NET parcial, sugerida para patógenos menores (ROCHAEL et al., 2015; YOUSEFI et al., 2009). Além disso, apesar de não envolver a morte das células na geração das NETs, estas foram geradas de uma maneira igualmente dependente de ROS, porém, por estresse mitocondrial a partir da ativação da superóxido dismutase 2 específica das mitocôndrias (YOUSEFI et al., 2009a).

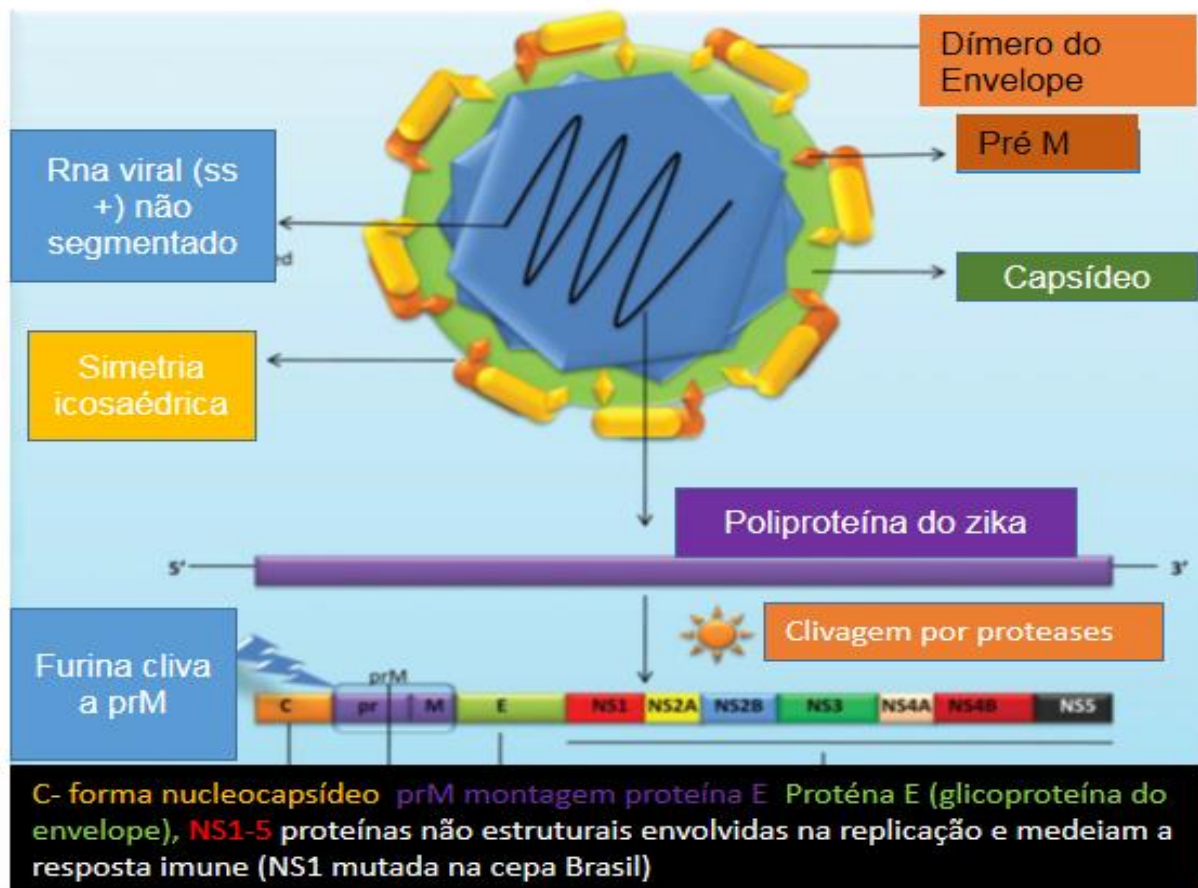
1.2 Vírus Zika (ZIKV)

O ZIKV foi isolado em Uganda no continente africano, na floresta do mesmo nome do vírus em 1947 (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Acredita-se que o

ancestral comum desse vírus tenha surgido há cerca de mil anos, em um ciclo infeccioso envolvendo primatas não-humanos e mosquitos. Somente há algumas centenas de anos a transmissão para os seres humanos ocorreu de forma independente (HOLMES; TWIDDY, 2003). A qual se dá no Brasil através, principalmente, de um mosquito vetor; do gênero *Aedes*, destacando a espécie *Aedes aegypti*. A disseminação por esses vetores e a vasta alternância de vírus que eles são capazes de transmitir tornam as áreas tropicais endêmicas do mosquito áreas de risco elevado para doenças virais graves, porém a única doença (dentre as arboviroses) capaz de ameaçar o desenvolvimento embrionário (efeito teratogênico) é a causada pelo ZIKV. Portanto ele se torna o maior esforço para a busca de vacina e o pior cenário caso ocorra uma pandemia, devido a comprovada disseminação por vias além do mosquito, como o coito (JULANDER et al., 2017; SINGH et al., 2016).

O vírus Zika pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, que inclui outros vírus de importância médica, como vírus da Febre Amarela, vírus do Oeste do Nilo, vírus da Encefalite Japonesa e o vírus Dengue (ALBARNAZ et al., 2014; BAI et al., 2010; MURPHY; WHITEHEAD, 2011; SCATURRO et al., 2018). São vírus envelopados, Figura 1, cujo genoma consiste de um RNA fita simples, com aproximadamente 11 kb, contendo uma única janela aberta de leitura a qual codifica uma poliproteína precursora, que é processada por proteases virais e do hospedeiro, dando origem a três proteínas estruturais, a proteína capsidial (C), a glicoproteína do envelope (E) e a proteína pré-membrana/membrana (prM/M), e sete proteínas não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, as quais estão envolvidas no ciclo replicativo do vírus (COSTA et al., 2007). As proteínas NS2B, NS3, NS4A, NS4B atuam na resposta imunológica de ZIKV subvertendo-a e regulando vias de morte celular como autofagia e apoptose, promovendo o escape viral (ALBARNAZ et al., 2014; HOU et al., 2017; MCLEAN et al., 2011; ZENG et al., 2016).

Figura 1 - Caracterização do ZikV, envelopado, RNA polaridade ss + não segmentado, simetria icosaédrica, que apresenta uma poliproteína que é clivada em proteína E, pré-M clivada por furinas, e proteínas não estruturais NS1, e demais proteínas imunogênicas envolvidas no escape, e NS5 polimerase.



2 REVISÃO DE LITERATURA

As redes extracelulares de DNA atuam como um mecanismo celular na defesa do organismo contra patógenos (GUIMARÃES-COSTA et al., 2012). Essas redes são geradas por quase todas as células que apresentam um papel fundamental na resposta imune (FIDELES et al., 2015).

Inicialmente descritas em neutrófilos, as redes extracelulares de neutrófilos (NETs) são compostas por fibras de cromatina descondensada, revestidas com histonas (H3 e H4 com modificações) e enzimas granulares de neutrófilos, tais como mieloperoxidase (MPO), elastase neutrofílica (NE), catepsina G, lactoferrina e catelecidinas (LL-37) (BRINKMANN et al., 2004; FUCHS et al., 2007; PAPAYANNOPOULOS et al., 2010; PHAM, 2006; TRIPATHI et al., 2014).

Logo, estas estruturas são liberadas em resposta a agentes infecciosos ou mediadores inflamatórios, levando à captura e morte de micro-organismos patogênicos (BRANZK et al., 2014; URBAN et al., 2009). Apesar da formação das redes extracelulares servir como uma armadilha para bactérias e outros patógenos, sua produção excessiva pode levar ao dano de diversos tecidos (KNIGHT; CARMONA-RIVERA; KAPLAN, 2012; NARASARAJU et al., 2011; TRIPATHI et al., 2014).

A formação de redes extracelulares de DNA não é um mecanismo exclusivo dos neutrófilos. Alguns estudos vêm caracterizando a formação de estruturas similares às NETs em macrófagos (METs), mastócitos (MCETs), basófilos (BETs) e eosinófilos (EETs) (BRUNS et al., 2010; GOLDMANN; MEDINA, 2012; MORSHED et al., 2014; MUÑOZ-CARO et al., 2014). As redes extracelulares de DNA geradas por macrófagos são capazes de aprisionar e destruir uma variedade de bactérias (MOHANAN et al., 2013).

Os mastócitos foram também descritos pela sua capacidade antimicrobiana extracelular por intermédio da formação de “redes” de DNA e seus grânulos metacromáticos. Os basófilos são capazes de gerar redes extracelulares de DNA, sob condições de inflamação. As BETs contêm DNA mitocondrial, e ainda não foram caracterizadas como contendo DNA nuclear e proteínas de grânulos especificamente expressas pelos basófilos como heparina, histamina, leucotrienos e tromboxanos (MORSHED et al., 2014).

Por fim, estudos mostram um mecanismo de ação extracelular por eosinófilos para eliminar agentes infecciosos de forma rápida e eficiente (DWORSKI et al., 2011).

As redes extracelulares de DNA produzidas por eosinófilos são compostas por uma trama de fibras de DNA e proteínas de grânulos específicos de eosinófilos, tais como a proteína básica principal e a proteína catiônica eosinofílica (ECP). Essas proteínas são responsáveis por grande parte das funções citotóxicas feitas pelos eosinófilos, podendo ser protetoras contra helmintos e ao mesmo tempo nocivas, uma vez que quando expostas ao meio extracelular, causam lesões teciduais devido ao efeito citotóxico nas células do próprio organismo (SPENCER et al., 2014). O DNA expelido pelos eosinófilos, curiosamente, é de origem mitocondrial, parecendo não estar associado com a morte celular (YOUSEFI et al., 2009b). Um evento chave na sinalização intracelular para a formação das EETs parece ser a ativação da enzima NADPH oxidase (KHAN; PALANIYAR, 2017). Essa enzima está ligada à membrana de neutrófilos e de várias outras células (ARAI et al., 2014; MUÑOZ-CARO et al., 2014; OLAGNIER et al., 2014).

Portanto, uma vez que ocorra a inibição desta enzima por algum efeito farmacológico ou genético, pode resultar na diminuição de precursores e mediadores inflamatórios, entre eles as espécies reativas de oxigênio (ROS), que inibem completamente a capacidade dos eosinófilos em liberar EETs (ELLIS; MAYER; JONES, 1988; OSTAFIN et al., 2016; SIM et al., 2005). Além disso, estudos sugerem que a atividade fagocítica dos eosinófilos é em grande parte limitada, quando comparada a outras células fagocíticas, sugerindo que sua atividade bactericida possa ocorrer extracelularmente, provavelmente por intermédio da liberação de EETs.(GUIMARÃES-COSTA et al., 2012).

As redes extracelulares de neutrófilos (NETs) foram melhor descritas como redes em teia de DNA associadas aos seus grânulos específicos e azurófilos (elastase, mieloperoxidase, catepsina G, catelecidinas e defensinas, conhecidos conjuntamente como complexo azuroma) ao ambiente extracelular; nesse processo ocorrem modificações nas histonas (H3 e H4 principalmente) como a citrulinação, acetilação, fosforilação, para aumentar a atividade antimicrobiana feita pelo fator PAD4 (Figura 2) (BRINKMANN et al., 2004; FUCHS et al., 2007; NEELI; KHAN; RADIC, 2008; PAPAYANNOPOULOS et al., 2010; TRIPATHI et al., 2014) . No processo ocorre a captura e destruição de patógenos como vírus, fungos e bactérias, mas também ocorre a ativação de vias de estresse e morte celular promovidas por

alarminas (como a LL-37, que são padrões moleculares associados a dano celular) que podem culminar com o desenvolvimento de lúpus eritematoso sistêmico, gota (os cristais de urato formados na gota desencadeiam as nets), artrite reumatoide, asma, psoríase e outras condições caracterizadas por autoimunidades (Figura 3). Esse processo é desencadeado por sinais extracelulares propagados pelo receptor de sinalização extracelular (ERK) e/ou por vias ligadas ao PI3K/AKT/mTOR com participação de proteínas da autofagia (atg7, MAPLC3A/B) (BRUNS et al., 2010; DOUDA et al., 2014b; FUNCHAL et al., 2015b; HAKKIM et al., 2011b; JORCH; KUBES, 2017; SAITOH et al., 2012; SCHAUER et al., 2014; URBAN et al., 2009).

Figura 2 - Vias das NETs nuclear (lítica ou netose) e mitocondrial (não lítica, vital).

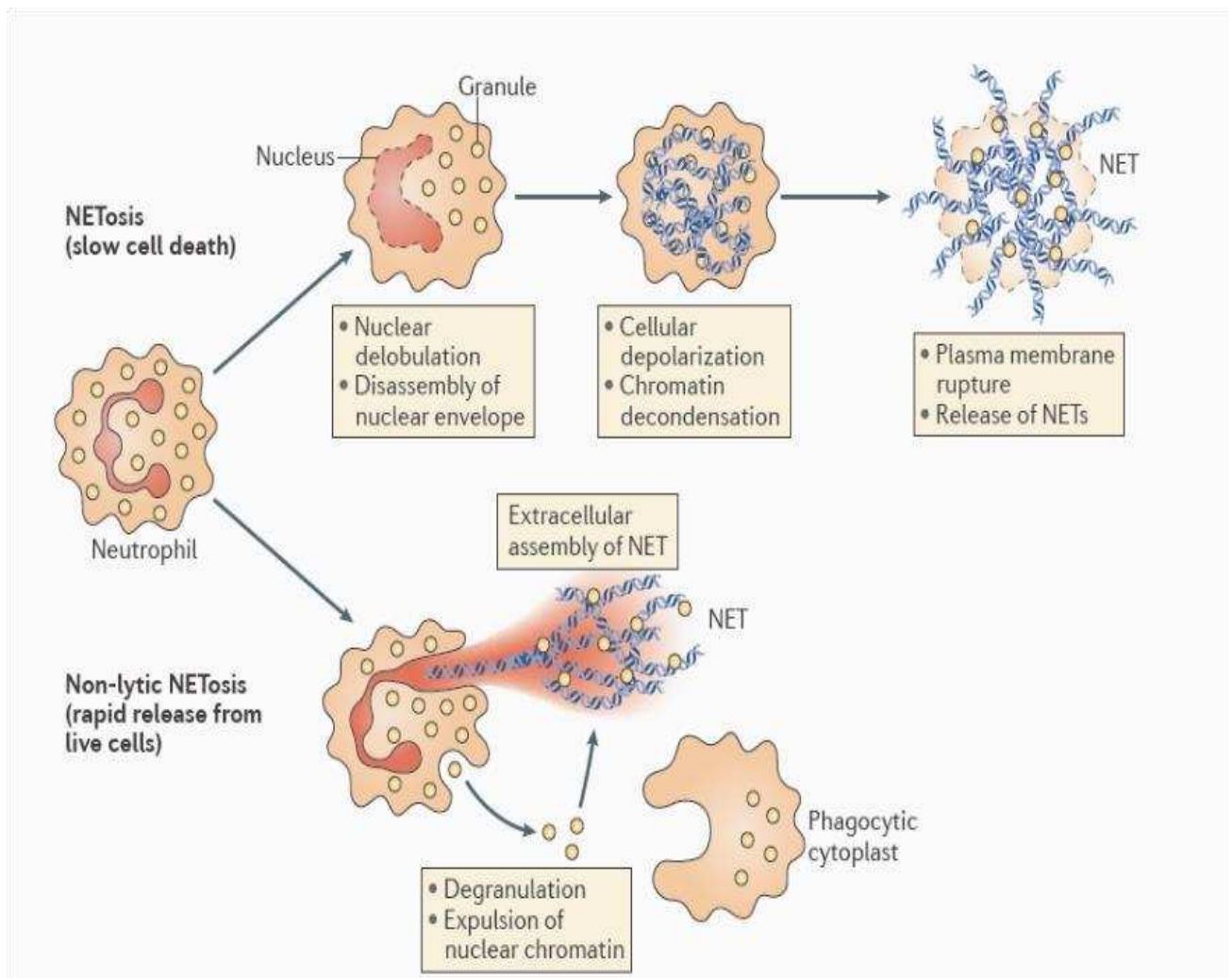
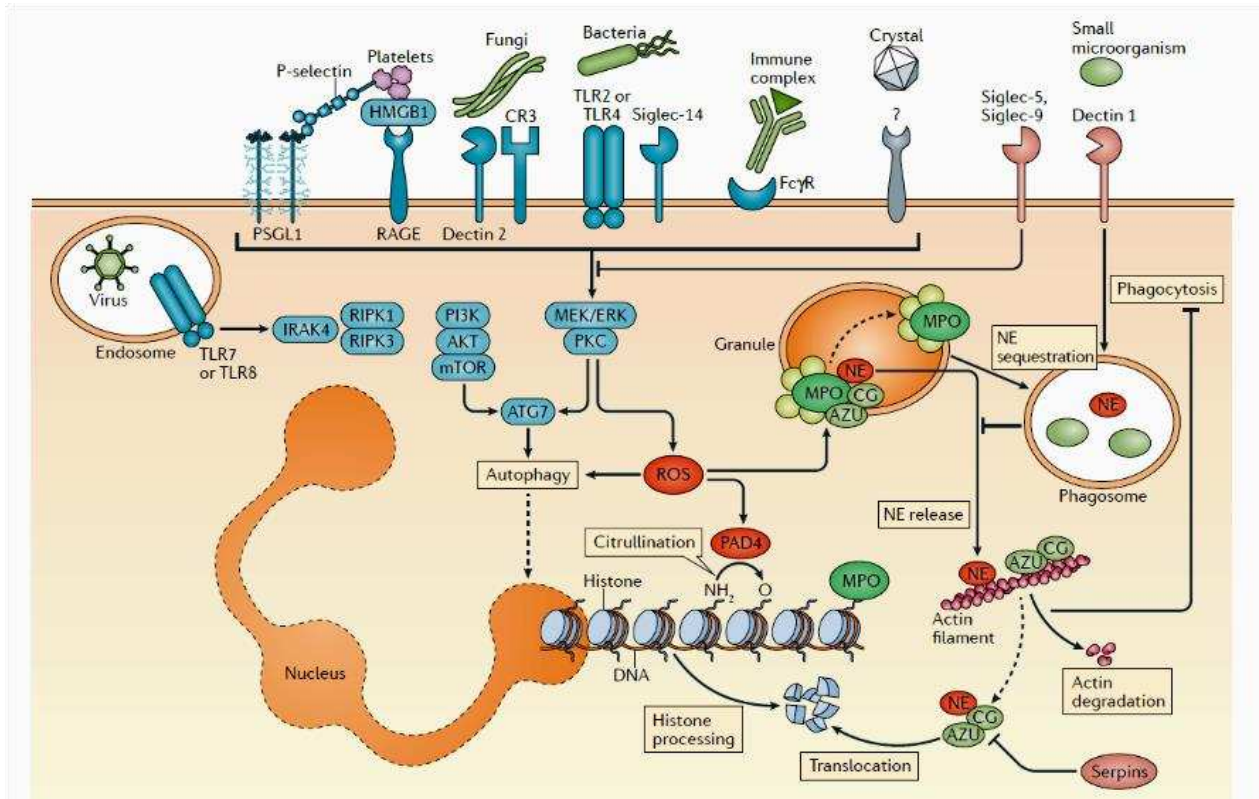


Figura 3 - vias ativadas pela rota nox2 ROS, MEK/ERK, NE elastase neutrofílica, MPO mieloperoxidase, histonas H3/4 citrulinada, ou via ativada pela SOD, mitoROS, canais SK3, AKT. Os passos finais da integração envolvem a ativação do complexo azuroma (MPO, NE, Catepsina G (CG) e do fator PAD4 que culmina com a mobilização do citoesqueleto de actina e a liberação de histonas citrulinadas. A via também é ativada ou inibida pela autofagia, pela via das PI3K/AKT/mTOR



Fonte: PAPAYANNOPOULOS, 2017.

Os neutrófilos são efetores fundamentais da imunidade inata celular, constituindo cerca de 70% de todos os leucócitos do ser humano. Essas células podem ser encontradas na circulação, onde vivem de seis a oito horas, e nos tecidos, onde podem residir sete dias numa inflamação aguda (JENNE et al., 2013b). Durante o curso de uma infecção essas células estão entre as primeiras a chegar aos sítios inflamatórios, onde elas têm um papel chave na eliminação de micro-organismos patogênicos e na produção de alarminas, agindo como pioneiros na resposta imune, juntamente com as barreiras inatas naturais (JAILLON et al., 2013; MANTOVANI et al., 2011). O mecanismo mais comum de eliminação de micro-organismos pelos neutrófilos é a fagocitose (GRESNIGT et al., 2012). Após o reconhecimento por

receptores inespecíficos de superfície de varredura dos neutrófilos, os patógenos são aprisionados em fagossomos e submetidos a defensas antimicrobianas, enzimas e espécies reativas do oxigênio (ROS), que levam à eliminação do micro-organismo patogênico (MITROULIS et al., 2011).

3 JUSTIFICATIVA

Após a fagocitose, muitos neutrófilos sofrem apoptose, como forma de morte celular limpa sem inflamação (KATO; KITAGAWA, 2006) e são eficientemente fagocitados por macrófagos, prevenindo a liberação de proteínas neutrofílicas que podem gerar danos teciduais pela continuidade da inflamação (KOLACZKOWSKA et al., 2015). Neutrófilos apoptóticos apresentam uma estrutura típica, na qual ocorre condensação da cromatina, fragmentação do DNA sem ruptura do envelope nuclear, formação de vacúolos no citoplasma, sendo que as organelas permanecem intactas e há a exposição de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática (YOON et al., 2014).

As NETs são estruturas extracelulares que têm DNA como principal componente de ação e associadas a histonas e proteínas granulares e nucleares, entre as quais algumas possuem atividade microbicida, como elastase, mieloperoxidase, catepsina G, lactoferrina, gelatinase, catelecidina (BRINKMANN et al., 2004, 2010; DELGADO-RIZO et al., 2017). O DNA e as histonas presentes no núcleo do neutrófilo também possuem atividade bactericida principalmente após a citrulinização das histonas (CHEN et al., 2014). O DNA age como um agente catiônico (quelante) devido ao seu esqueleto fosfodiéster, tornando-o capaz de romper membranas de bactérias, como *Pseudomonas aeruginosa* (FARLEY et al., 2012; HALVERSON et al., 2015; PINEGIN; VOROBJEVA; PINEGIN, 2015).

A atividade antimicrobiana das histonas tem sido observada não só para bactérias, mas também para protozoários, sendo que as histonas H2A e H2B reduzem em até 50% a replicação de promastigotas de *Leishmania* spp (DESOUZA-VIEIRA et al., 2016; ROCHAEL et al., 2015; WANG et al., 2011). A atividade microbicida dos componentes das NETs e sua rede composta de DNA tornam essas estruturas capazes de capturar e destruir patógenos (PAPAYANNOPOULOS; ZYCHLINSKY, 2009).

A produção de NETs é dependente de vários receptores da superfamília de imunoglobulinas Fc e receptores do tipo Toll (TLR) (HUANG et al., 2015; URBAN et al., 2009). O processo de formação das NETs, chamado de NETose, é um processo ativo que envolve o rearranjo da arquitetura nuclear, citoplasmática e granular do neutrófilo após o rearranjo do citoesqueleto (KHAN; PALANIYAR, 2017). Desde 2004 três modelos de NETose são conhecidos: (i) a NETose suicida, com duração de duas

a quatro horas, é o modelo mais estudado, embora seu processo molecular ainda não esteja totalmente elucidado (AL-KHAFAJI; TOHME, 2016; JORCH; KUBES, 2017). A NETose nesse modelo é dependente da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Ocorre ruptura das membranas intracelulares e mistura dos componentes nucleares e citoplasmático seguida de desintegração da membrana plasmática e liberação das NEs (KOLACZKOWSKA et al., 2015; VOROBJEVA; PINEGIN, 2014); (ii) a NETose vital, em que os neutrófilos liberam NETs sem ruptura da membrana nuclear ou plasmática, ocorre entre 5-60 minutos e é independente da produção de ROS. A liberação do DNA nuclear ocorre devida a três mudanças no arcabouço celular: crescimento do envelope nuclear com liberação de vesículas, descondensação nuclear e rompimento do envelope nuclear. Após a liberação das NETs esses neutrófilos, ainda vivos, são capazes de fagocitar patógenos e sua vida útil não é afetada pela perda de DNA (BRANITZKI-HEINEMANN et al., 2016; DESAI et al., 2016; DOUDA et al., 2015); e (iii) o último modelo descrito é outro tipo de NETose vital, que é dependente de ROS e ocorre a liberação de DNA mitocondrial ao invés de DNA nuclear. Esse processo consiste na liberação de NETs em 15 minutos, após reconhecimento do fator do complemento C5a ou lipopolissacarídeo (LPS) (DWORSKI et al., 2011; YOUSEFI et al., 2008, 2009a).

Estudos demonstram que o processo de NETose difere dos processos de apoptose e necrose por apresentar características morfológicas distintas. Diferentemente da morte celular limpa que forma apoptossomos (estruturas prontas para a fagocitose que alertam o sistema de defesa sobre a integridade alterada da membrana plasmática), durante a formação das NETs não há exposição de fosfatidilserina na membrana celular ou fragmentação de DNA, bem como perda da permeabilidade celular, características clássicas de necrose e apoptose (FUCHS et al., 2007; LIM et al., 2017).

Neutrófilos sob estímulos diferentes (IL-8, LPS, PMA, bactérias, fungos, plaquetas ativadas, AGES (produtos de glicação avançada), cristais de urato iniciam um processo ativo, levando à formação das NETs, as quais poderão ocasionar sua morte. Alguns estímulos, como forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), induzem NETs dependentes da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

3.1 NETs e Vírus

Neutrófilos são recrutados para sítios da infecção viral, mas seu papel durante a infecção ainda não foi elucidado. *In vivo* a formação das NETs é dependente da enzima PAD4, responsável pela citrulinização das histonas, com consequente descondensação do DNA, levando à formação das NETs (KOLACZKOWSKA et al., 2015; MARTINOD et al., 2016; RAO et al., 2012).

Em alguns estudos utilizando vírus Influenza foi demonstrado que neutrófilos são importantes em limitar a replicação viral, enquanto em outros estudos, o recrutamento de neutrófilos resultou em aumento da morte celular epitelial, ou seja, dano tecidual ou escape viral, atuando como cavalo de Troia (veículo para eficiente dispersão e replicação), replicando no neutrófilo (CORTJENS et al., 2016; JENNE et al., 2013; NARASARAJU et al., 2011; SAFFARZADEH et al., 2012).

A interação entre neutrófilos e os vírus é menos explorada do que aquelas envolvendo patógenos maiores, especialmente no que diz respeito à geração das NETs. Um estudo de 2010, utilizando felinos infectados com o Vírus da Leucemia Felina (FeLV), demonstrou que a produção de NETs pode ser estimulada pela infecção viral (WARDINI et al., 2010). Foi demonstrada a competência do vírus hRSV (vírus sincicial respiratório) em induzir a liberação de NETs por neutrófilos em humanos. Neste estudo, a proteína de fusão do vírus foi um estímulo indutor das NETs assim como os estímulos clássicos como o PMA e LPS. Foi verificado que as NETs apresentavam DNA nuclear como componente predominante, além de mieloperoxidase e elastase neutrofílica (FUNCHAL et al., 2015).

Saitoh e colaboradores mostraram em experimentos *ex vivo*, que durante uma infecção por HIV-1 (Vírus da Imunodeficiência Humana do Tipo-1), há envolvimento de neutrófilos na resposta imunológica do hospedeiro e, por microscopia eletrônica, detectaram partículas do vírion aprisionadas pelas NETs. Além disso, foi observado que a eficiência de infecção do HIV-1 diminuía significativamente após ser capturado pelas NETs, mostrando seu papel na inativação das partículas virais (SAITOH et al., 2012), o que foi confirmado *in vivo* na mucosa vaginal humana (BARR et al., 2018). Em outro estudo foi demonstrado haver uma maior ocorrência de NETs em indivíduos com inflamação nas vias aéreas inferiores durante a infecção pelo vírus H1N1 (Influenza A) (NARASARAJU et al., 2011).

3.2 Doenças agravadas pelas NETs

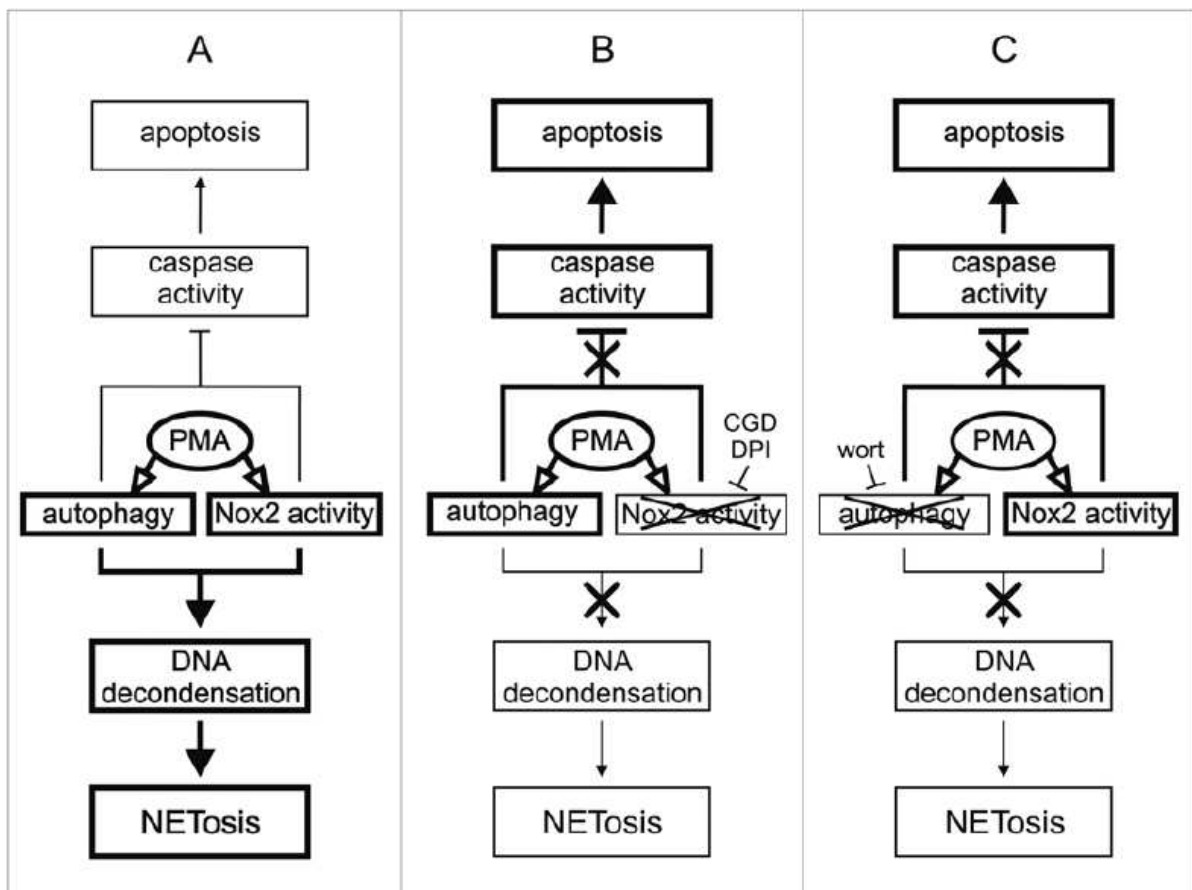
Além da sua função antimicrobiana, as NETs também possuem um lado deletério para o corpo, podendo causar graves doenças, pois a citotoxicidade das NETs pode ser prejudicial para o hospedeiro. A formação excessiva de NETs é observada em várias doenças, incluindo lúpus, gota, asma, vasculite, sepse e câncer, sendo, no último caso, a elastase uma das principais proteínas que facilitam a migração pelos outros tecidos na metástase (COOLS-LARTIGUE; SPICER, 2013; KNIGHT; CARMONA-RIVERA; KAPLAN, 2012). As NETs induzem ativação plaquetária, que pode levar a distúrbios de coagulação e trombos vasculares (ETULAIN et al., 2015; JORCH; KUBES, 2017). A netose ainda tem sido associadas ao desenvolvimento e complicações de doenças respiratórias como asma e doença obstrutiva pulmonar crônica. Quando exaustivamente recrutados para o tecido pulmonar em resposta a uma infecção, os neutrófilos podem romper a microcirculação alveolar e induzir ocorrência de NETose. Pacientes com disfunções pulmonares demonstram níveis mais elevados de DNA extracelular do que pacientes com doenças pulmonares moderadas, demonstrando que as NETs participam efetivamente da obstrução do fluxo aéreo perpetuando a resposta inflamatória crônica (DWORSKI et al., 2011; GRABCANOVIC-MUSIJA et al., 2015; PEDERSEN et al., 2015).

3.3 Controle e contenção das NETs

Autofagia e apoptose são vias pelas quais os vírus e outros patógenos escapam das NETs e subvertem a resposta imune reduzindo a inflamação e a resposta antiviral por interferon alfa (AGUIRRE; FERNANDEZ-SESMA, 2017; CHENG et al., 2016; HE et al., 2016). São, entretanto, vias de prevenção das autoimunidades geradas pelas NETs, pois inibem o estresse oxidativo e promovem a limpeza da área afetada retirando as alarminas, promovendo o reparo tecidual em associação aos macrófagos e atuando na resolução da inflamação (Figura 4, 5, 6 e 7 detalham os processos) (GALLUZZI et al., 2017; HEATON; RANDALL, 2011; MITROULIS et al., 2010). As doenças causadas por zika, dengue e Mayaro apresentam sintomas distintos que se agravam em alguns casos dependendo da susceptibilidade do sistema imune do hospedeiro. Porém os biomarcadores de susceptibilidade são pouco conhecidos, sabe-se que ocorre a estimulação completa da via das nets em indivíduos

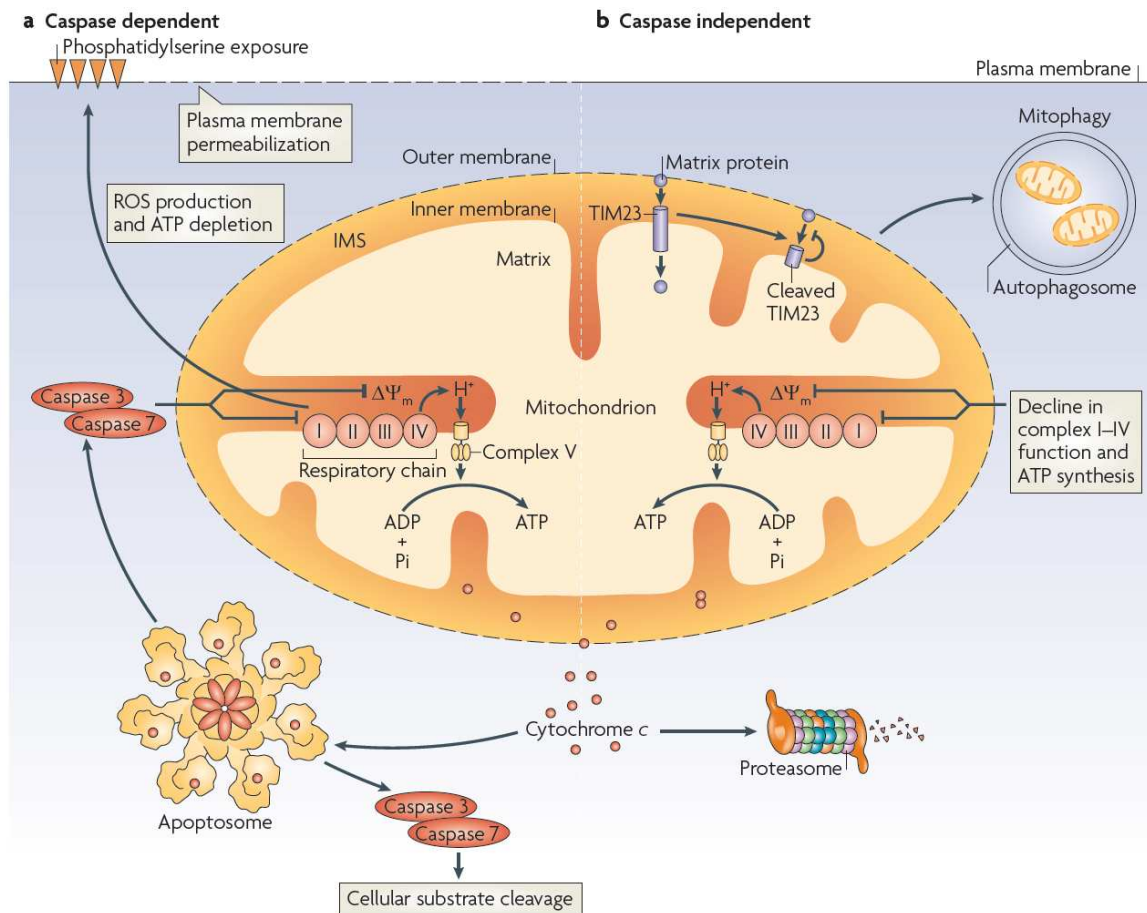
com casos graves de dengue, e que a vacina comercial desenvolvida não pode ser administrada faixas de idade com baixa imunidade. Por outro lado há predominância de autofagia e rotas de inibição das nets em grávidas com zika, e o grande desafio é caso essa epidemia volte é conter um vírus num sistema imune comprometido.

Figura 4 - Integração das vias de NETs, autofagia e apoptose: o PMA estimula as NETs pela ação da NADPoxidase 2 (Nox2) e o escape, caso a apoptose seja ativada inibindo o estresse oxidativo. O DPI é mostrado como um inibidor da rota do estresse oxidativo pela inibição da Nox2 e das NETs geradas por ROS, e como um indutor da autofagia. O inibidor da autofagia wortmannin inibe toda a cascata pois atua nos receptores comuns da indução das NETs e autofagia pelo PMA. A seta com X sob inibidor, indica inibição do inibidor da apoptose, e a consequente ativação da apoptose.



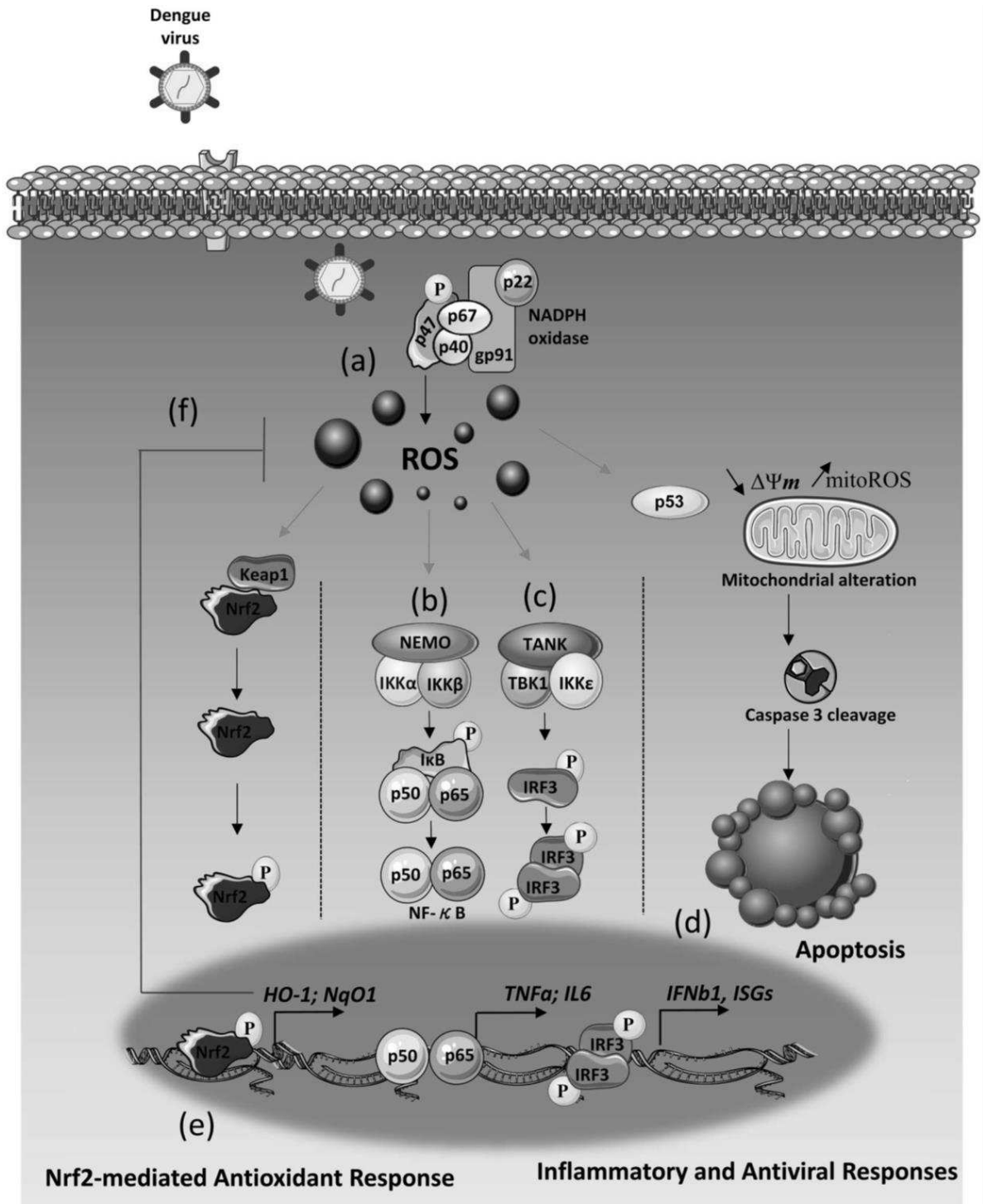
Fonte: REMIJSEN et al., 2011.

Figura 5 - Vias de integração da apoptose, que ocorre mediante a dano mitocondrial (alarminas), estresse oxidativo (ROS), exposição da fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática (alarminas) e clivagem da caspase 3 (marcador final das vias convergentes das caspases). Também é mostrado que a mitocôndria danificada pode desencadear a formação de autofagolisossomos desencadeando a apoptose ou autofagia de forma independente das caspases.



Fonte: TAIT; GREEN, 2010.

Figura 6 - Análise de estresse oxidativo em monócitos submetidos ao vírus Dengue, demonstrando o vírus escapando da morte (gerada pela apoptose conforme o caminho d) que seria ativada por *ros* (através de *NF-KappaBeta* nos caminhos b e c) através da expressão do Nrf2 (caminho das letras e,f) que atua no sistema antioxidante da célula, inibindo o complexo NADPH oxidase composto pelas proteínas p47, p40, p67, p22 (mostradas em a).



3.4 NETs em doenças causadas por *Flavivirus*

Em casos graves de dengue, há a confirmação de neutropenia, indução de degranulação dos neutrófilos e níveis elevados de elastase, além de ativação das proteínas MAPK e AKT, o que sugere que os vírus Dengue podem deflagrar as NETs pelos danos (alarminas) gerados ao não serem limpos pelo corpo levando a manifestações graves e ao óbito (HOANG et al., 2010). Esse processo é diretamente associado ao agravamento dos casos de dengue, que podem estar relacionados aos casos mais severos da doença, confirmando que as NETs são ativadas (OPASAWATCHAI et al., 2019).

3.5 NETs em Zika

Para os indivíduos infectados com Zika, foi confirmada apenas a neutropenia e nada se sabe sobre as NETs, principalmente no contexto fetal, que é ativada em condições patológicas como abortos por pré-eclâmpsia (GUPTA et al., 2005). Porém as vias de apoptose e autofagia vêm sendo bastante discutidas em relação ao escape viral (FERNANDES et al., 2017; ZHANG; LI; YUAN, 2017). Esses processos de morte celular limpa (sem inflamação) são ativados pelo braço regulador da imunidade e são fundamentais para o progresso da gravidez, visto a necessidade do não reconhecimento do feto como não próprio pelo sistema imune materno porém, o Zika burla esse sistema e replica usando justamente a tolerância como escape (ZHANG; LI; YUAN, 2017).

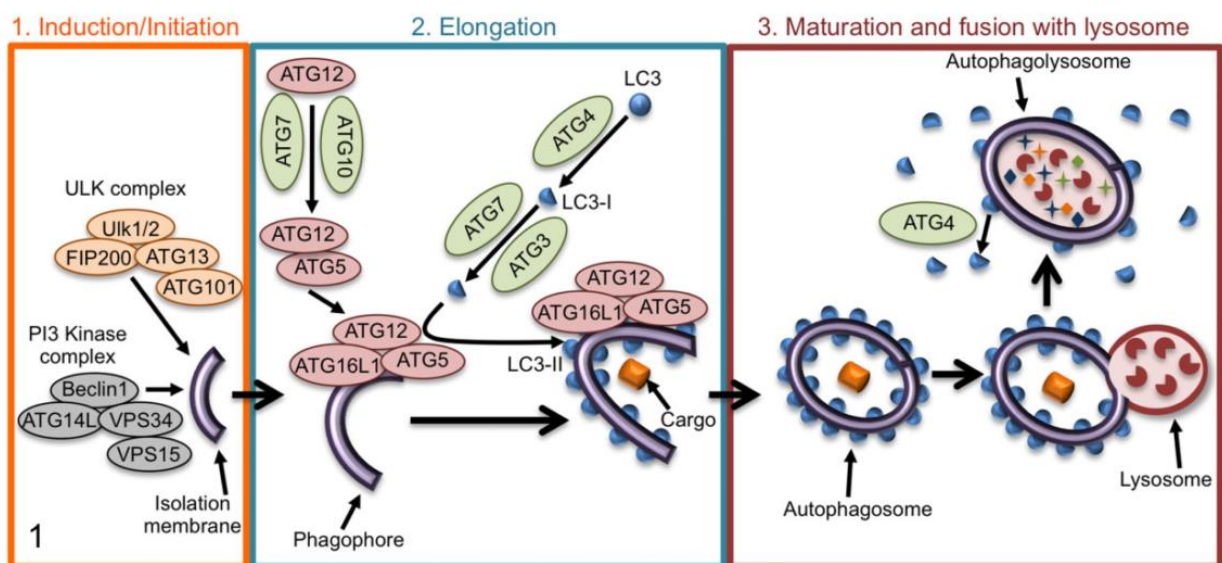
A via completa de escape do vírus Zika em precursores de neurônios já foi descrita em relação ao proteoma, sinalização, precursores, proteínas virais com a participação de mais de 40 proteínas, mas nada se sabe dessa via em relação à resposta imune com a participação de neutrófilos, (figura 8) (SCATURRO et al., 2018).

3.6 Autofagia

Os estimuladores da autofagia normalmente são os mesmos que são usados nas vias necessárias para formar as NETs como o FLMP, PMA, Zymosan e LPS. As vias inflamatórias, quando ativadas pelos TLRs na imunidade inata, devem ser rapidamente contidas em casos estéreis de inflamação para a manutenção da

homeostase do sistema imune e do corpo, sendo a autofagia o principal regulador desse processo (Figuras 9 e 10) (ITAKURA; MCCARTY, 2013).

Figura 7 - Etapas de formação da autofagia e fatores envolvidos. Nesse esquema é mostrada a via PI3K na indução, a etapa de alongação promovida pelas MAP1LC3-I/II e os ATGs, e a etapa de maturação e formação dos autofagolisossomo. A autofagia regula diferentes fases do sistema imunológico desde a hematopoese na medula, fagocitose, apoptose, apresentação de antígenos pelas APCs, produção de citocinas e inflamação e morte celular.



Fonte: KINSELLA; NEHLS; STALLINGS, 2018.

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo Geral:

Avaliar a influência do vírus Zika (ZIKV) nas vias que contribuem para a formação de redes extracelulares de neutrófilos (NETs) em humanos saudáveis, *ex vivo*.

4.2 Objetivos Específicos:

- 4.2.1 Avaliar a formação de NETs induzida por ZIKV;
- 4.2.2 Avaliar o processo de autofagia em presença de ZIKV;
- 4.2.3 Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em presença de ZIKV e consequente ativação das vias de eliminação viral (ERK ou AKT);
- 4.2.4 Avaliar a indução de apoptose por ZIKV.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Cepas Virais

Os vírus Zika utilizados neste trabalho foram cedidos pelo Professor Rafael França (Fiocruz/PE) e isolados de indivíduos infectados no Brasil. O estoque viral foi propagado em células C6/36 isoladas de *Aedes albopictus* e titulado em células VERO (CALEGARI et al., 2016).

5.2 Purificação de neutrófilos

Para analisar o efeito do ZIKV foram incubados neutrófilos purificados do sangue de nove doadores voluntários saudáveis (projeto registrado na UFV, com o número 21213268414). Os neutrófilos foram purificados por centrifugação com gradiente de *Mono-Poly Resolving Media: (M-PRM; MP Biomedicals)* e cultivados em meio mínimo DMEN 2% (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) por quatro horas (37°C 5% de CO₂ com ZIKV).

5.3 Microscopia de epifluorescência

Foram utilizados vírus com multiplicidade de infecção dez (*Multiplicity Of Infection* - MOI 10) sobre um total de 3×10^5 neutrófilos pré-aderidos com 0,01% v/v de Poly-L-Lysina (Sigma). Como controles positivos foram usados indutores de NETs e autofagia como o PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate sigma) (100 ng/ml), FMLP (N-Formyl-Met-Leu-Phe₂ Sigma) (5 mg/mL), Zymosan (Sigma) (ligante dos TLR's 2 e 6) ou indutor de estresse oxidativo (ROS) como o peróxido de hidrogênio (Sigma) (REMIJSEN et al., 2011). O controle negativo adotado foi o mesmo sobrenadante da cultura de células (SCC) usado para o vírus, além dos inibidores DPI ou seu análogo DIP (PAPAYANNOPOULOS, 2017b). Após quatro horas, os neutrófilos foram fixados em paraformaldéido 4% por vinte minutos, lavados em HBSS, e corados com DAPI (diamidino-2-fenilindole Biotium, Inc., Hayward, CA, EUA) (1:10000) ou Acridine Orange (AO) (1:10000) (Thermo Fisher Scientific, Inc.) foi diluída (1/100) a partir da solução de estoque na concentração de 1 mg/mL. A montagem foi feita em lâminas

foscas com meio de montagem sacarose 50% e avaliados em microscópio de fluorescência Olympus BX 53 (Olympus, Tokyo, Japan).

5.4 Imunomarcação para elastase, histona e vírus

A imunomarcação foi realizada para histona H4 acetilada, elastase neutrofílica humana, além do núcleo por DAPI, e repetido com marcações duplas de anticorpos para a detecção da proteína E utilizando anticorpo monoclonal Panflavivirus e da via de morte celular analisada para detecção da ERK 1/2, vírus e DAPI. Foi realizada a análise das imagens mediante a captura de fotos usando o EvosFL ou o microscópio monocromático Olympus BX 53 e óleo de imersão, quando necessário. As imagens foram processadas usando o *Adobe Photoshop*[®] ou o *ImageJ* (<https://imagej.nih.gov/ij/>) (AGUIRRE et al., 2017; KRAAIJ et al., 2016).

5.5 Ensaio de ROS

Neutrófilos (2×10^6 células/microtubo) foram pré-tratados com DPI (10 μ M) e estimulados com ZIKV por sessenta minutos à 37 °C sob 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram incubadas com 0.5 μ M DCFDA por trinta minutos à 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂. A produção citosólica de ROS foi mensurada por citometria de fluxo usando o FACSverse (Becton Dickinson) e analisadas utilizando o software FlowJo v7.5.

5.6 Quantificação do DNA extracelular

Foi feita a quantificação das NETs pela análise de imagens obtidas como descrito no item 5.4 e foi avaliada a área de duzentos e cinquenta núcleos por grupo usando um total de mil fotos de neutrófilos à magnificação de 400X através do software *Image Pro Plus 4.5* (*Media Cybernetics, Silver Spring, USA*). Para a quantificação específica do conteúdo de DNA, foram novamente co-incubados os vírus e neutrófilos em placas pretas de 96 poços por quatro horas seguindo os procedimentos de tratamento com 16 μ M DPI (controle negativo), 100 U/ml DNase I (controle de artefatos em relação a ligantes inespecíficos do DNA), PMA (controle positivo) e as concentrações de vírus e neutrófilos com MOI (*multiplicity of infection*)

10. Para quantificação do DNA foram adicionados 2µg de iodeto de propídeo e a fluorescência mensurada nos comprimentos de onda (excitação 544 nm, emissão 612) utilizando leitor de fluorescência de microplaca (*Spectramax plus 384, BMG Labtech, Germany*).

5.7 Caspase 3 clivada na apoptose

Fez-se o ensaio de apoptose usando a marcação da clivagem da caspase 3 e mediante detecção do vírus ZIKV ambos por anticorpos conforme protocolo da bula dos anticorpos, incubados por duas horas, lavado e incubado por mais duas horas com o anticorpo secundário conjugado com FITC (murino) e TRITC (coelho) respectivamente de forma semelhante ao descrito para células de cultura de pulmão (FRUMENCE et al., 2016).

5.8 Ensaio de sinalização

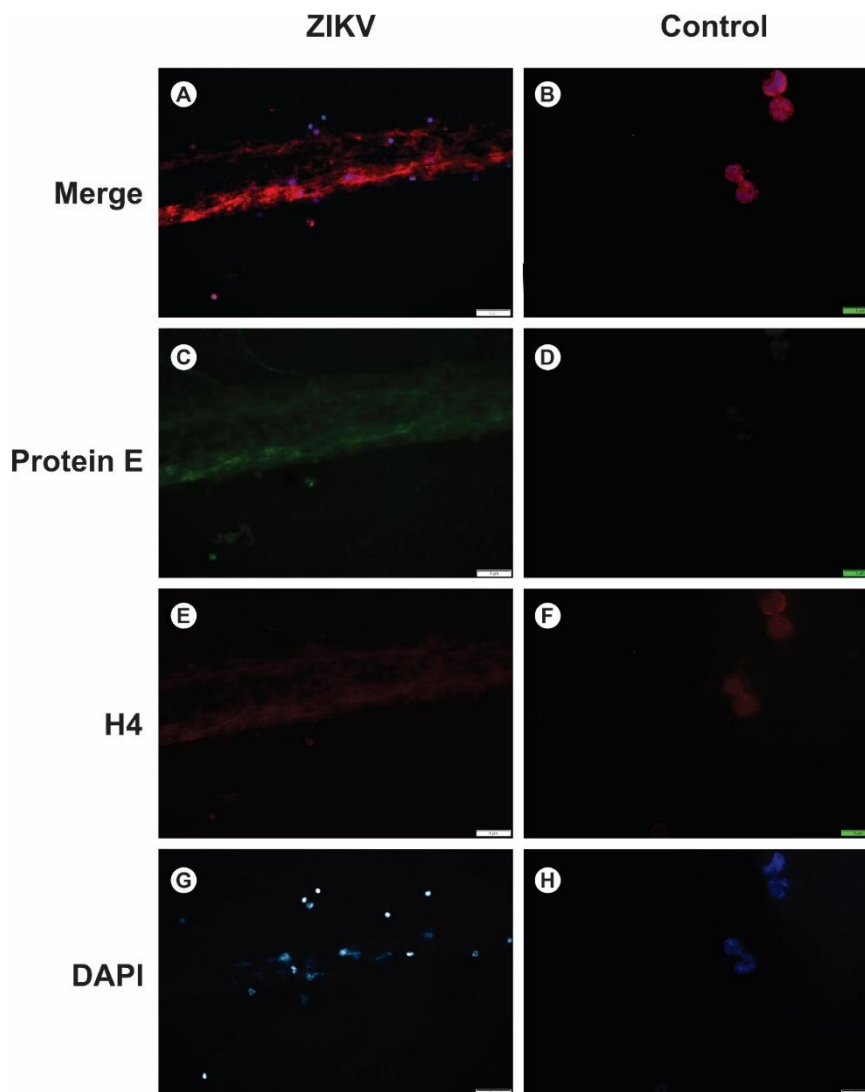
Mediante incubação das células com estímulos virais (MOI 10) seguindo o protocolo já descrito por duas e quatro horas e a adição de p-ERK-FITC (Biolegend) e p-AKT-PE (R&D system) conforme bula, as células foram incubadas em presença de anticorpos por quinze minutos e lavados por centrifugação com a troca do meio. A ativação das vias da MAPK e da AKT-PI3K em neutrófilos foi medida por FACS (DOUDA et al., 2014a; HAKKIM et al., 2011a), como controle foram usadas células não estimuladas e monodansylcadaverina (MDC ou CAD) (BALAJTHY et al., 2006).

6 RESULTADOS

6.1 Visualização de NETs

Através da Imunofluorescência com marcadores específicos para o ZIKV podemos notar a formação de NETs e a colocalização da proteína E e da histona H4 (Figura 8).

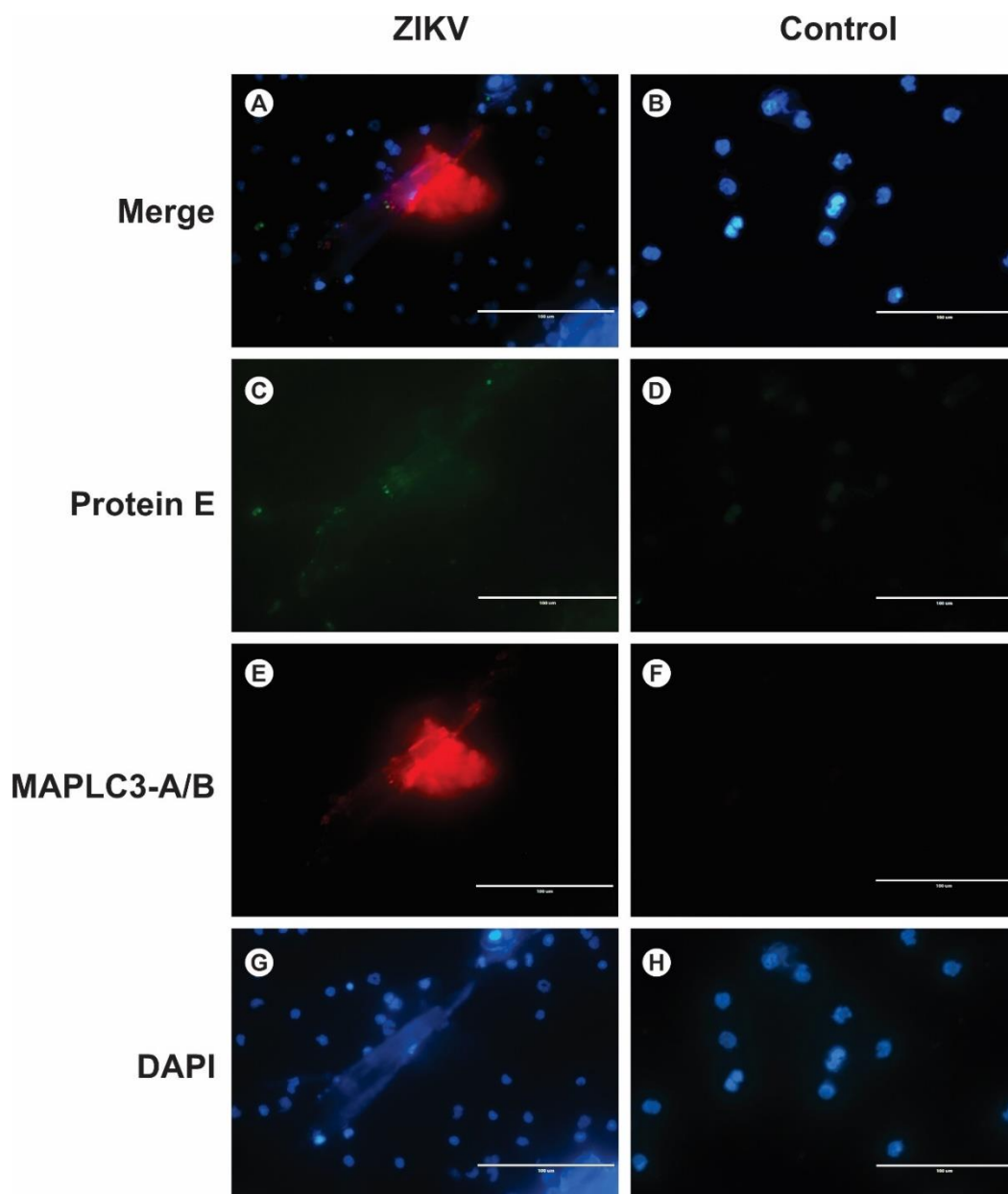
Figura 8 - Imunofluorescência dos marcadores específicos de NETs figura A merge, os ZIKV foram visualizados na teia das NETs pela detecção da proteína E viral figura B (FITC), histona H4 acetilada (TRITC) figura C, em D DAPI, em E observamos o controle negativo merge na figura E, em F observamos ausência de marcação da proteína E (FITC) e em F, a presença de marcação da histona H4 (TRICT) dentro do neutrófilo, em G e H DAPI.



6.2 Visualização de NETs e Autofagia

Para evidenciar a correlação, entre NETs e autofagia podemos observar a colocalização entre ZIKV/NET/MAPLC3 (Figura 9) evidenciado dessa maneira a correlação entre ZIKV e o processo de autofagia.

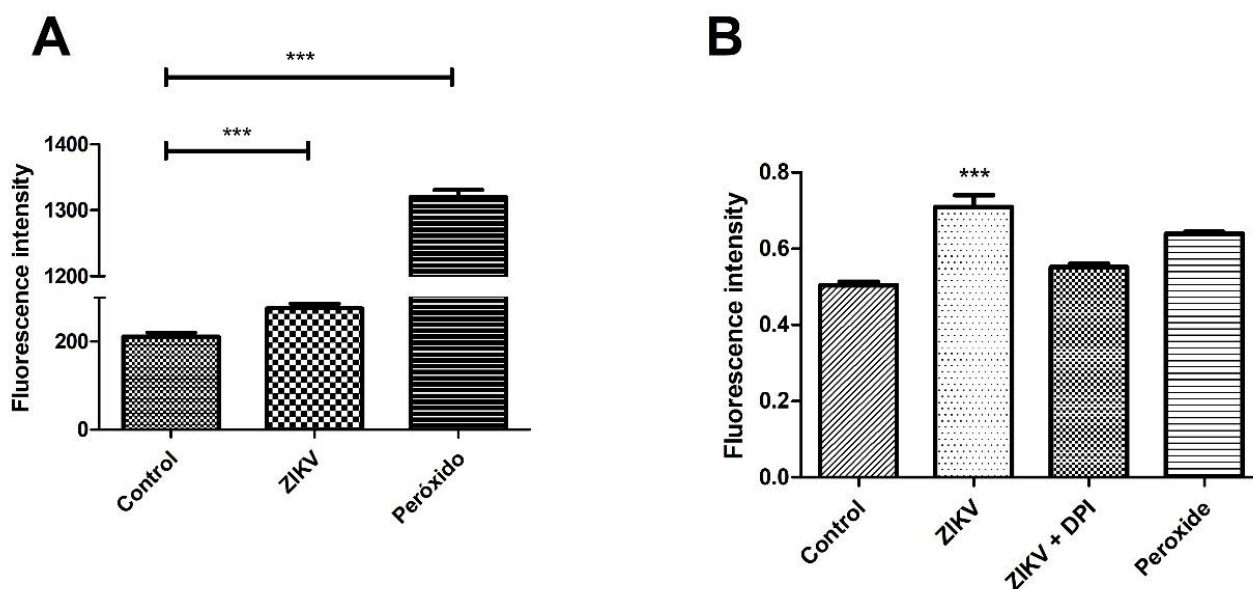
Figura 9 - Correlação NETs e autofagia por Imunofluorescência dos marcadores específicos figura A, proteína E (FITC) na teia das NETs figura B, autofagia marcada pela MAPLC3-A/B (TRITC) figura C, e dapi (DNA) figura D, controle negativo meio figura E ausência de NETs, figura F ausência de marcação da proteína E (FITC), figura G ausência de marcação para autofagia (TRITC) e ausência de NETs no dapi figura H.



6.3 Correlação NET produção de ROS, e sinalização pERK e pAKT

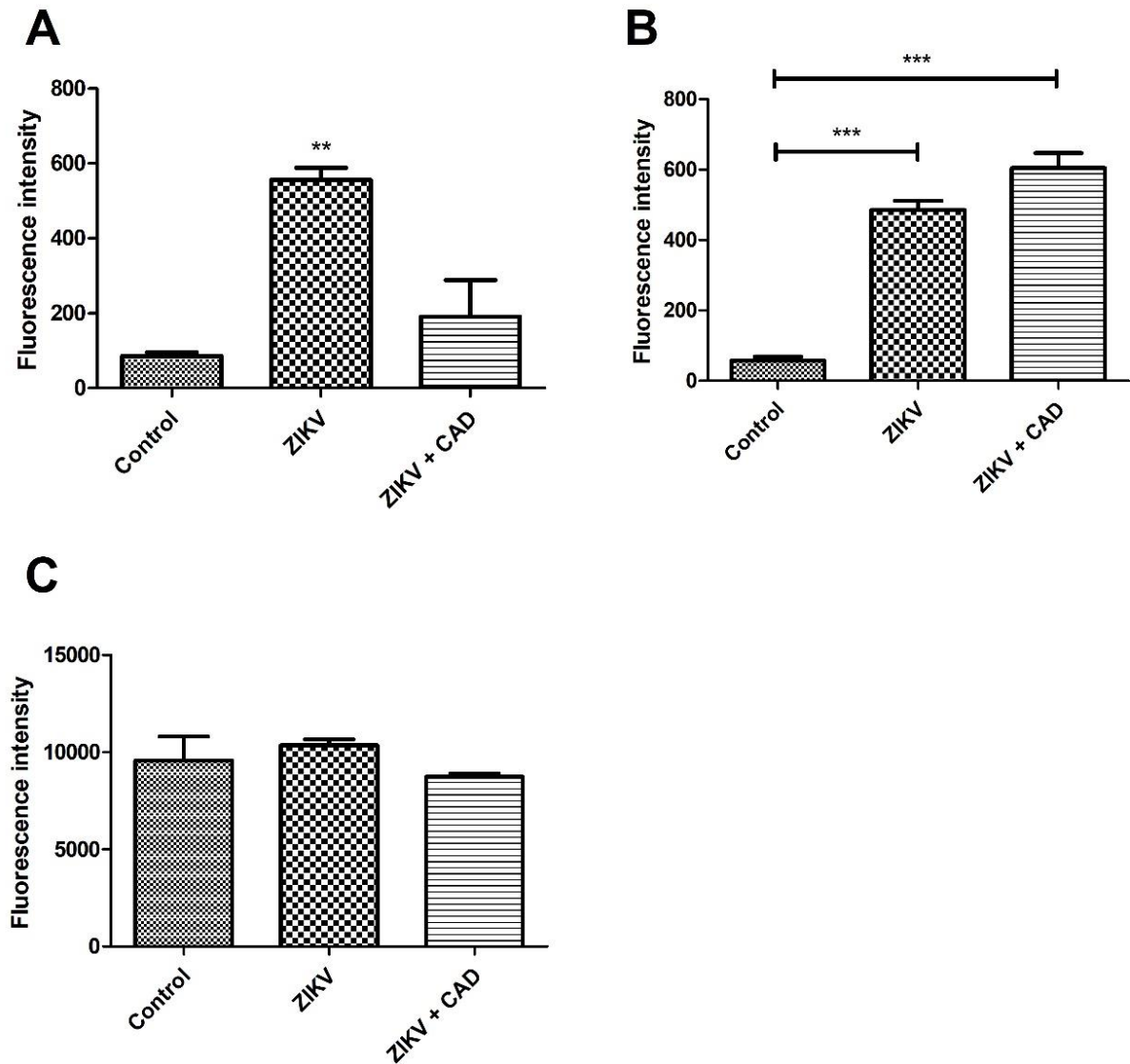
Os indicadores de estresse oxidativo foram medidos pela oxidação da DCFDA (ROS total) gerados pela comparação dos tratamentos contendo Zika, os controles sobrenadante de cultura celular SCC e indutores Zymosan ou peróxido de hidrogênio (figura 10 A e B). Os resultados são observados na figura 13, que mostra que a oxidação da DCFDA, ou seja, o estresse gerado pelo Zika é menor do que o peróxido (Figura 10A) e maior que o controle negativo SCC em neutrófilos. A atividade da peroxidase foi maior com a estimulação de MOI 10 do zika em relação ao controle SCC e ao peróxido em neutrófilos (Figura 10B).

Figura 10 - Estresse oxidativo e sinalização foram medidos por FACS, pela oxidação da DCFDA (ROS total) pela comparação dos tubos contendo Zika ($P < 0,05$) e com os controles sobrenadante de cultura celular SCC e indutores Zymosan ou peróxido de hidrogênio figura A e B separadas por ANOVA e teste de Tukey. A figura 10A mostra que a oxidação da DCFDA, ou seja, o estresse gerado pelos tubos com Zika é menor do que o peróxido ($*** P < 0,001$) (10a) e maior que o controle negativo SCC (#) em neutrófilos. A atividade da peroxidase foi maior com a estimulação de MOI 10 do zika em relação ao controle SCC e em neutrófilos (figura 10B), mesmo adicionado DPI (inibidor da NADPoxidase).



Os resultados foram semelhantes para a proteína pERK associada ao estresse oxidativo e ativação das vias de NETs (Figura 11A). A via pAKT também foi ativada junto com a via da pERK (Figura 11B) em duas horas de estimulação. Com quatro horas a estimulação é maior apenas em relação ao inibidor CAD (figura 11C).

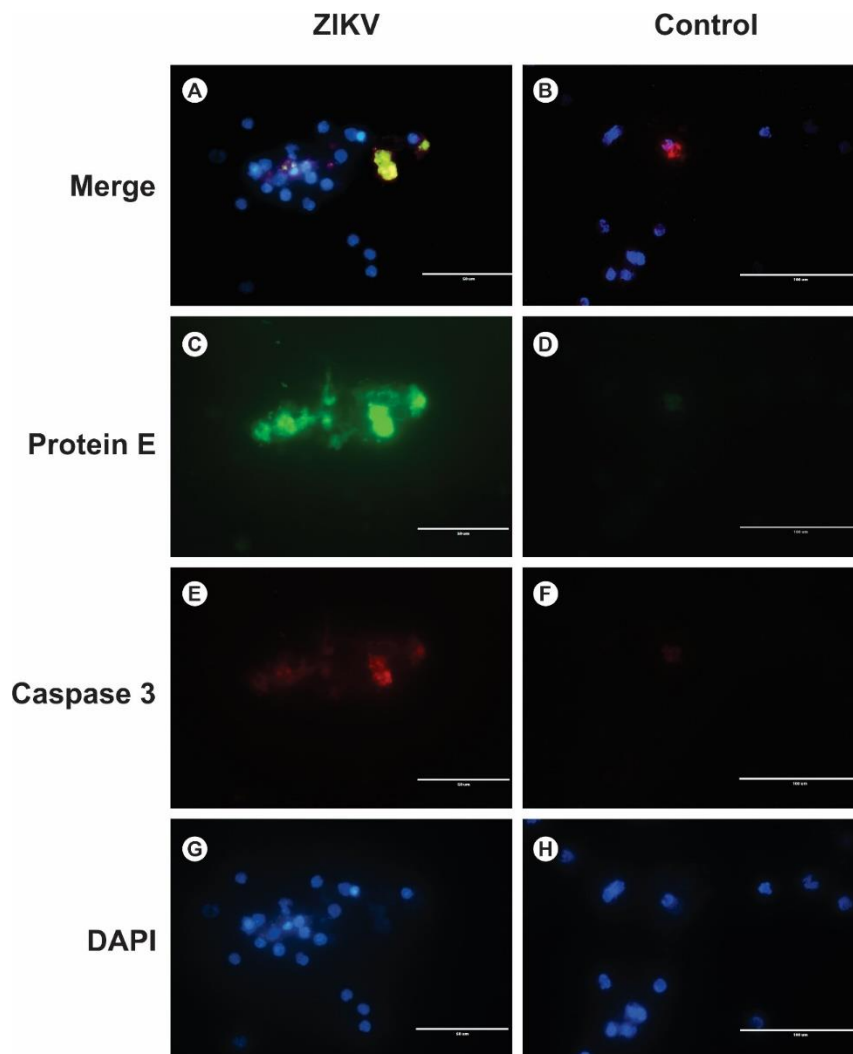
Figura 11 - Os resultados foram semelhantes à proteína pERK associada ao estresse oxidativo e ativação das vias de NETs na (figura 11A), zika ($p < 0,05$) se comparada ao controle negativo e à CAD. A outra via pAKT também foi ativada junto com a via da pERK (figura 11B) em duas horas de estimulação pelo zika se comparado ao controle negativo. Com quatro horas, a estimulação das vias é maior apenas em relação ao CAD (#) (figura 11C).



6.4 Análise de apoptose.

Foi visualizada marcação de proteína de apoptose por imunofluorescência dos marcadores específicos, a proteína E do ZIKV em verde por FITC, em associação a apoptose marcada pela caspase 3 clivada TRITC (Figura 12). Não houve diferença entre a quantificação de Annexin V entre o grupo controle e o grupo ZIKV (dados não mostrados) o que indica que o processo de apoptose não é estimulado por ZIKV e que as respostas de NETs não sofrem escape por essa via.

Figura 12 - Imunomarcacão de proteína de apoptose por Imunofluorescência dos marcadores específicos figura A merge (B, C e D), a proteína E do ZIKV (FITC) figura B, apoptose marcada pela Caspase 3 clivada (TRITC) figura C, em 12D DAPI, em E é mostrado o controle negativo em merge das figuras F,4G e 4H, em F a ausência de marcação da proteína E (FITC) e em G, a presença de marcação de apoptose também no controle (TRITC), e H dapi DNA.



7 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a apresentar estimulação das vias de estresse oxidativo em neutrófilos por Zika, aumento da atividade da mieloperoxidase, ativação simultânea das vias da ERK e AKT e ativação das vias de NETs (histona H4 acetilada) e autofagia (MAP LC3A/B) em neutrófilos humanos infectados com vírus Zika. Esse processo sofre interferência quando utilizamos o inibidor das transglutaminases como a mono-dansyl-cadaverina (CAD) que indica que o mesmo intervém nas vias de autofagia e infecção viral, avaliados no presente trabalho. A marcação para apoptose não diferiu do controle o que indica que esse processo não interfere na formação das NETs e não é usado como escape viral.

Os eventos de fosforilação específicos ao longo de vias de sinalização foram descritos para Zika em precursores de neurônios destacando a modulação de processos-chave como ATM, AKT-mTOR e cascatas de sinalização ERK-MAPK (SCATURRO et al., 2018).

Na literatura foi identificada uma forte regulação negativa da via de sinalização AKT-mTOR, como indicado pela desfosforilação de substratos AKT1 conhecidos (por exemplo, DNMT1, TBC1D4 e LARP6), alvos mTOR (por exemplo, ANKRD17, LARP1, PATL1 e EEF2K), a cinase central S6K e sua principal proteína efetora S6, cuja via é descrita em outro estudo (ZENG et al., 2016). Consistente com esses resultados, foi encontrada fosforilação aumentada de proteínas, como o regulador negativo da autofagia DAP, em resíduos de aminoácidos conhecidos por inibirem a função supressora da proteína, o que é consistente com a noção de que a autofagia é induzida após infecção por ZIKV consoante com vários trabalhos (HAMEL et al., 2015; ZHANG; LI; YUAN, 2017). Os autores observaram que o ZIKV regrediu a via de sinalização MAPK-ERK, desde A-RAF e ERK2, bem como vários substratos a jusante. As cinases ERK1/2 (EIF4EBP1, BAZ1B e TWIST) foram significativamente desfosforiladas na infecção pelo ZIKV (SCATURRO et al., 2018), sendo o primeiro estudo a mostrar o efeito inibitório dessa via, entretanto o resultado do presente trabalho, que apresenta estimulação das vias em neutrófilos, foi o bem diferente como mostrado pela proteína pERK num modelo ex vivo de neutrófilos purificados em humanos adultos saudáveis. O que é explicado pela divergência de sintomas causados pelo vírus no adulto e no feto: no adulto, o vírus migra para órgãos imunoprivilegiados e escapa da ação dos neutrófilos observada no presente trabalho.

Nas células de Müller (células gliais da retina ricas em AXL e altamente permissivas ao ZIKV), a via da MAPK p38 é ativada sendo responsável pelos sintomas de conjuntivite do ZIKV, a inibição da via reduz os sintomas pró-inflamatórios dessa região (ZHU et al., 2017).

As vias ERK1/2 e mTOR convergem na S6K e modulam sua fosforilação, sugerindo múltiplos mecanismos possíveis que poderiam contribuir para a expressão positiva induzida pelo ZIKV na autofagia, com diminuição da proliferação de hNPC e comprometimento da neurogênese (SCATURRO et al., 2018). No presente trabalho o efeito da ativação da autofagia nos neutrófilos provocou o efeito oposto, as vias da ERK e AKT foram estimuladas com o ZIKV, indicando que as NETs prevalecem em relação às vias de escape (a apoptose foi idêntica aos controles no presente trabalho) e são possivelmente a causa da efetividade da resposta imunológica do Zika em adultos. Mais estudos são necessários para entender quais as vias e quais fatores levam à inibição das vias de NETs e infecção viral nas pessoas susceptíveis ao vírus na fase adulta.

A neutropenia é caracterizada como um risco em pacientes com ZIKV já que os neutrófilos são vistos como células capazes de defender a mucosa dos órgãos sexuais de outros vírus como o HIV, estimulando células dendríticas a ativarem as NETs e a destruírem o vírus HIV, porém isso ainda não foi mostrado para o ZIKV (BARR et al., 2018; GOVERO et al., 2016). Mais estudos devem ser feitos em relação à transmissão do ZIKV em mucosas sexuais para saber se as NETs são efetivas na defesa dessa região. Propomos que a neutropenia observada em pacientes com ZIKV pode ser explicada pela rápida estimulação das vias de NETs e autofagia levando à morte celular dos neutrófilos.

A estimulação simultânea da autofagia e das NETs pelo ZIKV em neutrófilos, demonstrada pela estimulação de vias de ROS, ERK fosforilada e AKT fosforilada é indicativo de que não ocorre escape da via de NETs *ex vivo* pelo ZIKV por apoptose. Um estudo avaliou que essas vias são inibidas pelo vírus da hepatite B no qual ocorre escape viral das NETs pela redução da ROS, inibição da via da ERK e ausência de marcação da MAPLC3A/B (HU et al., 2019). A única forma de escape possível é o escape do ZIKV para os órgãos imunoprivilegiados, em que existe pouca ou nenhuma ação de neutrófilos, e, com isso, é possível escapar das NETs.

Outro mecanismo de escape usado pelo HIV ocorre através da ação da lectina CD209, também conhecida como DC-SIGN (receptor do ZIKV e HIV), um mecanismo

de inibição das NETs pela indução da secreção de IL10 por outras células do sistema imune, como as células dendríticas que inativam a resposta celular dos neutrófilos (SAITOH et al., 2012). Esse mecanismo de escape não funciona no aparelho reprodutor, e as NETs são capazes de defender a mucosa vaginal do ataque inicial do vírus HIV (BARR et al., 2018), a mesma lectina DC-SIGN é um dos receptores do ZIKV (HAMEL et al., 2015; WANG et al., 2016).

8 CONCLUSÃO

Foi evidenciada a ocorrência de uma via capaz de eliminar o ZIKV usando a autofagia e NETs;

Não foram encontrados dados conclusivos de que o ZIKV possui-se qualquer via de escape dos neutrófilos humanos avaliados dentro do desenho experimental desse estudo, visto que a apoptose não se modificou na avaliação;

Pode-se concluir que o zika estimula vias de estresse oxidativo em neutrófilos que culminam nas NETs com autofagia e sem significativa ativação de apoptose.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, S. et al. Dengue virus NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during infection. **Nature Microbiology**, v. 2, n. March, p. 17037, 2017.

AGUIRRE, S.; FERNANDEZ-SESMA, A. Collateral Damage during Dengue Virus Infection: Making Sense of DNA by cGAS. **Journal of Virology**, v. 91, n. 14, p. e01081-16, 2017.

AL-KHAFAJI, A. B.; TOHME, S. Superoxide Induces Neutrophil Extracellular Trap Formation in a TLR-4 and NOX-Dependent Mechanism. **Molecular Medicine**, v. 22, n. 1, p. 1, 2016.

ALBARNAZ, J. D. et al. MEK/ERK activation plays a decisive role in yellow fever virus replication: Implication as an antiviral therapeutic target. **Antiviral Research**, v. 111, p. 82–92, 2014.

ARAI, Y. et al. Uric acid induces NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 443, n. 2, p. 556–561, 2014.

BAI, F. et al. A paradoxical role for neutrophils in the pathogenesis of West Nile virus. **The Journal of infectious diseases**, v. 202, n. 12, p. 1804–1812, 2010.

BALAJTHY, Z. et al. Tissue-transglutaminase contributes to neutrophil granulocyte differentiation and functions. **Blood**, v. 108, n. 6, p. 2045–2054, 2006.

BARR, F. D. et al. Neutrophil extracellular traps prevent HIV infection in the female genital tract. **Mucosal Immunology**, v. 11, n. 5, p. 1420–1428, 2018.

BARTH, S.; GLICK, D.; MACLEOD, K. F. Autophagy: Assays and artifacts. **Journal of Pathology**, v. 221, n. 2, p. 117–124, 2010.

BRANITZKI-HEINEMANN, K. et al. Formation of neutrophil extracellular traps under low oxygen level. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. NOV, p. 1–9, 2016.

BRANZK, N. et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. **Nature Immunology**, v. 15, n. 11, p. 1017–1025, 2014.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. v. 303, n. March, p. 1532–1535, 2004.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil Extracellular Traps: How to Generate and Visualize Them. **Journal of Visualized Experiments**, n. 36, p. 36–38, 2010.

BRUNS, S. et al. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000873, 2010.

CALEGARI, L. P. et al. Multi-walled carbon nanotubes increase antibody-producing B cells in mice immunized with a tetravalent vaccine candidate for dengue virus. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2016.

CHEN, R. et al. Release and activity of histone in diseases. **Cell Death and Disease**, v. 5, n. 8, p. e1370-9, 2014.

CHENG, Y.-L. et al. Activation of Nrf2 by the dengue virus causes an increase in CLEC5A, which enhances TNF- α production by mononuclear phagocytes. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 32000, 2016.

COOLS-LARTIGUE, J.; SPICER, J. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. **The Journal of clinical ...**, v. 123, n. 8, p. 3446–3458, 2013.

CORTJENS, B. et al. Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease. **The Journal of Pathology**, v. 238, n. 3, p. 401–411, 2016.

COSTA, S. M. et al. DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: The influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. **Virology**, v. 358, n. 2, p. 413–423, 2007.

DELGADO-RIZO, V. et al. Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: An overview. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. FEB, p. 1–20, 2017.

DESAI, J. et al. Matters of life and death. How neutrophils die or survive along NET release and is “NETosis” = necroptosis? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 11–12, p. 2211–2219, 2016.

DESOUZA-VIEIRA, T. et al. Neutrophil extracellular traps release induced by *Leishmania*: role of PI3K, ERK, PI3K, PKC, and [Ca²⁺]. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. 4, p. 801–810, 2016.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 46:5, n. September, p. 509–520, 1952.

DOUDA, D. N. et al. Akt is essential to induce NADPH-dependent NETosis and to switch the neutrophil death to apoptosis To the editor: Akt is essential to induce NADPH-dependent NETosis and to switch the neutrophil death. p. 597–600, 2014a.

DOUDA, D. N. et al. To the editor: Akt is essential to induce NADPH-dependent NETosis and to switch the neutrophil death to apoptosis. **Blood**, v. 123, n. 4, p. 597–600, 2014b.

DOUDA, D. N. et al. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 9, p. 2817–2822, 2015.

DWORSKI, R. et al. Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 5, p. 1260–1266, 2011.

ELLIS, J. A.; MAYER, S. J.; JONES, O. T. The effect of the NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium on aerobic and anaerobic microbicidal activities of human neutrophils. **The Biochemical journal**, v. 251, n. 3, p. 887–91, 1988.

ETULAIN, J. et al. P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. **Blood**, v. 126, n. 2, p. 242–246, 2015.

FARLEY, K. et al. A SerpinB1 Regulatory Mechanism Is Essential for Restricting Neutrophil Extracellular Trap Generation. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 9, p. 4574–4581, 2012.

FERNANDES, N. C. C. . et al. Experimental Zika virus infection induces spinal cord injury and encephalitis in newborn Swiss mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 69, n. 2, p. 63–71, 2017.

FIDELES, F. et al. Mecanismos moleculares de formação das armadilhas extracelulares dos neutrófilos e seu papel na imunidade inata Molecular mechanisms of neutrophil extracellular traps formation and their role in innate immunity. v. 23, n. 2, p. 3–8, 2015.

FRUMENCE, E. et al. The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- β production and apoptosis induction. **Virology**, v. 493, p. 217–226, 2016.

FUCHS, T. A. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **Journal of Cell Biology**, v. 176, n. 2, p. 231–241, 2007.

FUNCHAL, G. A. et al. Respiratory syncytial virus fusion protein promotes TLR-4-dependent neutrophil extracellular trap formation by human neutrophils. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–14, 2015a.

FUNCHAL, G. A. et al. Respiratory syncytial virus fusion protein promotes TLR-4-dependent neutrophil extracellular trap formation by human neutrophils. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–14, 2015b.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines : recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. p. 107–120, 2012.

GALLUZZI, L. et al. Pharmacological modulation of autophagy: Therapeutic potential and persisting obstacles. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 7, p. 487–511, 2017.

GOLDMANN, O.; MEDINA, E. The expanding world of extracellular traps: Not only neutrophils but much more. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JAN, p. 1–10, 2012.

GOVERO, J. et al. Zika virus infection damages the testes in mice. **Nature**, v. 540, n. 7633, p. 438–442, 2016.

GRABCANOVIC-MUSIJA, F. et al. Neutrophil extracellular trap (NET) formation characterises stable and exacerbated COPD and correlates with airflow limitation. **Respiratory Research**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2015.

GRESNIGT, M. S. et al. Neutrophil-Mediated Inhibition of Proinflammatory Cytokine Responses. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 10, p. 4806–4815, 2012.

GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. ETosis: A microbicidal mechanism beyond cell death. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, n. Table 1, 2012.

GUPTA, A. K. et al. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. **Human Immunology**, v. 66, n. 11, p. 1146–1154, 2005.

HAKKIM, A. et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. **Nature chemical biology**, v. 7, n. 2, p. 75–77, 2011a.

HAKKIM, A. et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 2, p. 75–77, 2011b.

HALVERSON, T. W. R. et al. DNA Is an Antimicrobial Component of Neutrophil Extracellular Traps. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 1, p. 1–23, 2015.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **J Virol**, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 2015.

HE, Z. et al. Dengue Virus Subverts Host Innate Immunity by Targeting Adaptor Protein MAVS. **Journal of Virology**, v. 90, n. 16, p. 7219–7230, 2016.

HEATON, N. S.; RANDALL, G. Dengue virus and autophagy. **Viruses**, v. 3, n. 8, p. 1332–1341, 2011.

HOANG, L. T. et al. The Early Whole-Blood Transcriptional Signature of Dengue Virus and Features Associated with Progression to Dengue Shock Syndrome in Vietnamese Children and Young Adults. **Journal of Virology**, v. 84, n. 24, p. 12982–12994, 2010.

HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, n. 1, p. 19–28, 2003.

HOU, S. et al. Zika virus hijacks stress granule proteins and modulates the host stress response. **Journal of Virology**, n. June, p. JVI.00474-17, 2017.

HU, S. et al. Hepatitis B Virus Inhibits Neutrophil Extracellular Trap Release by Modulating Reactive Oxygen Species Production and Autophagy. n. 17, 2019.

HUANG, H. et al. Damage-associated molecular pattern-activated neutrophil extracellular trap exacerbates sterile inflammatory liver injury. **Hepatology**, v. 62, n. 2, p. 600–614, 2015.

ITAKURA, A.; MCCARTY, O. J. T. Pivotal role for the mTOR pathway in the formation of neutrophil extracellular traps via regulation of autophagy. **AJP: Cell Physiology**, v. 305, n. 3, p. C348–C354, 2013.

JAILLON, S. et al. Neutrophils in innate and adaptive immunity. **Seminars in Immunopathology**, v. 35, n. 4, p. 377–394, 2013.

JENNE, C. N. et al. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. **Cell Host and Microbe**, v. 13, n. 2, p. 169–180, 2013a.

JENNE, C. N. et al. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. **Cell Host and Microbe**, v. 13, n. 2, p. 169–180, 2013b.

JORCH, S. K.; KUBES, P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. **Nature Medicine**, v. 23, n. 3, p. 279–287, 2017.

JULANDER, J. G. et al. Efficacy of the broad-spectrum antiviral compound BCX4430 against Zika virus in cell culture and in a mouse model. **Antiviral Research**, v. 137, p. 14–22, 2017.

KATO, T.; KITAGAWA, S. Regulation of Neutrophil Functions by Proinflammatory Cytokines. **International Journal of Hematology**, v. 84, n. 3, p. 205–209, 2006.

KESHARI, R. S. et al. Cytokines Induced Neutrophil Extracellular Traps Formation: Implication for the Inflammatory Disease Condition. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.

KESHARI, R. S. et al. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 3, p. 532–540, 2013.

KHAN, M. A.; PALANIYAR, N. Transcriptional firing helps to drive NETosis. **Scientific Reports**, v. 7, n. September 2016, p. 1–16, 2017.

KINSELLA, R. L.; NEHLS, E. M.; STALLINGS, C. L. Roles for Autophagy Proteins in Immunity and Host Defense. **Veterinary Pathology**, p. 030098581875496, 2018.

KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **Autophagy**, v. 12, n. 1, p. 1–222, 2016.

KNIGHT, J. S.; CARMONA-RIVERA, C.; KAPLAN, M. J. Proteins derived from neutrophil extracellular traps may serve as self-antigens and mediate organ damage in autoimmune diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. DEC, p. 1–12, 2012.

KOLACZKOWSKA, E. et al. Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–13, 2015.

KRAAIJ, T. et al. A novel method for high-throughput detection and quantification of neutrophil extracellular traps reveals ROS-independent NET release with immune complexes. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 6, p. 577–584, 2016.

LIM, S. M. et al. Transcriptomic Analyses Reveal Differential Gene Expression of Immune and Cell Death Pathways in the Brains of Mice Infected with West Nile Virus and Chikungunya Virus. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. August, p. 1–16, 2017.

LOOD, C. et al. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. **Nature Medicine**, v. 22, n. 2, p. 146–153, 2016.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 519–531, 2011.

MARTINOD, K. et al. Neutrophil elastase-deficient mice form neutrophil extracellular traps in an experimental model of deep vein thrombosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 14, n. 3, p. 551–558, 2016.

MCLEAN, J. E. et al. Flavivirus NS4A-induced Autophagy Protects Cells against Death and Enhances Virus Replication * □. v. 286, n. 25, p. 22147–22159, 2011.

MITROULIS, I. et al. Regulation of the autophagic machinery in human neutrophils. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 5, p. 1461–1472, 2010.

MITROULIS, I. et al. Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1 β and autophagy-related signaling in gout. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. 1–10, 2011.

MOHANAN, S. et al. Identification of macrophage extracellular trap-like structures in mammary gland adipose tissue: A preliminary study. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. MAR, p. 1–8, 2013.

MORSHED, M. et al. NADPH Oxidase-Independent Formation of Extracellular DNA Traps by Basophils. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 11, p. 5314–5323, 2014.

MUÑOZ-CARO, T. et al. *Besnoitia besnoiti* tachyzoites induce monocyte extracellular trap formation. **Parasitology Research**, v. 113, n. 11, p. 4189–4197, 2014.

MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Immune Response to Dengue Virus and Prospects for a Vaccine. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 587–619, 2011.

NARASARAJU, T. et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. **American Journal of Pathology**, v. 179, n. 1, p. 199–210, 2011.

NEELI, I.; KHAN, S. N.; RADIC, M. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 3, p. 1895–1902, 2008.

OLAGNIER, D. et al. Cellular Oxidative Stress Response Controls the Antiviral and Apoptotic Programs in Dengue Virus-Infected Dendritic Cells. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 12, p. 1–18, 2014.

OPASAWATCHAI, A. et al. Neutrophil Activation and Early Features of NET Formation Are Associated With Dengue Virus Infection in Human. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. January, 2019.

OSTAFIN, M. et al. Different procedures of diphenyliodonium chloride addition affect neutrophil extracellular trap formation. **Analytical Biochemistry**, v. 509, p. 60–66, 2016.

PAPAYANNOPOULOS, V. et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. **Journal of Cell Biology**, v. 191, n. 3, p. 677–691, 2010.

PAPAYANNOPOULOS, V. Neutrophil extracellular traps in. **Nature Publishing Group**, p. 1–14, 2017a.

PAPAYANNOPOULOS, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. **Nature Reviews Immunology**, p. 1–14, 2017b.

PAPAYANNOPOULOS, V.; ZYCHLINSKY, A. NETs: a new strategy for using old weapons. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 11, p. 513–521, 2009.

PEDERSEN, F. et al. Neutrophil extracellular trap formation and extracellular DNA in sputum of stable COPD patients. **Respiratory Medicine**, v. 109, n. 10, p. 1360–1362, 2015.

PHAM, C. T. N. Neutrophil serine proteases: Specific regulators of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 7, p. 541–550, 2006.

PINEGIN, B.; VOROBEVA, N.; PINEGIN, V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v. 14, n. 7, p. 633–640, 2015.

RAO, R. et al. Combination of Pan-Histone Deacetylase Inhibitor and Autophagy Inhibitor Exerts Superior Efficacy against Triple-Negative Human Breast Cancer Cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 11, n. 4, p. 973–983, 2012.

REMIJSEN, Q. et al. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. **Cell Research**, v. 21, n. 2, p. 290–304, 2011.

ROCHAEL, N. C. et al. Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by Leishmania parasites. **Scientific Reports**, v. 5, n. April, p. 18302, 2015.

SAFFARZADEH, M. et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: A predominant role of histones. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

SAITOH, T. et al. Neutrophil Extracellular Traps Mediate a Host Defense Response to Human Immunodeficiency Virus-1. **Cell Host & Microbe**, v. 12, n. 1, p. 109–116, 2012.

SCATURRO, P. et al. An orthogonal proteomic survey uncovers novel Zika virus host factors. 2018.

SCHAUER, C. et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. **Nature Medicine**, v. 20, n. 5, p. 511–517, 2014.

SIM, S. et al. NADPH Oxidase-Derived Reactive Oxygen Species-Mediated Activation of ERK1/2 Is Required for Apoptosis of Human Neutrophils Induced by *Entamoeba histolytica*. **The Journal of Immunology**, v. 174, p. 4279–4288, 2005.

SINGH, R. K. et al. Zika virus – emergence, evolution, pathology, diagnosis, and control: current global scenario and future perspectives – a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, v. 36, n. 3, p. 150–175, 2016.

SPENCER, L. A. et al. Eosinophil secretion of granule-derived cytokines. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, p. 1–9, 2014.

TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 9, p. 621–632, 2010.

TRIPATHI, S. et al. LL-37 modulates human neutrophil responses to influenza A virus. **Journal of leukocyte biology**, v. 96, n. 5, p. 931–8, 2014.

URBAN, C. F. et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, 2009.

VOROBEVA, N. V; PINEGIN, B. V. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 79, n. 12, p. 1286–96, 2014.

WANG, P. et al. DC-SIGN as an attachment factor mediates Japanese encephalitis virus infection of human dendritic cells via interaction with a single high-mannose residue of viral E glycoprotein. **Virology**, v. 488, n. 2016, p. 108–119, 2016.

WANG, Y. et al. Differential microbicidal effects of human histone proteins H2A and H2B on *Leishmania* promastigotes and amastigotes. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 3, p. 1124–1133, 2011.

WARDINI, A. B. et al. Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. **Journal of General Virology**, v. 91, n. 1, p. 259–264, 2010.

YOON, S. et al. Caspase-dependent cell death-associated release of nucleosome and damage-associated molecular patterns. **Cell Death and Disease**, v. 5, n. 10, p. e1494-14, 2014.

YOUSEFI, S. et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. **Nature Medicine**, v. 14, n. 9, p. 949–953, 2008.

YOUSEFI, S. et al. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. **Cell death and differentiation**, v. 16, n. 11, p. 1438–44, 2009a.

YOUSEFI, S. et al. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 11, p. 1438–1444, 2009b.

ZENG, J. et al. Short Article Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy Short Article Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neura. **Stem Cell**, v. 19, n. 5, p. 663–671, 2016.

ZHANG, Z.-W.; LI, Z.-L.; YUAN, S. The Role of Secretory Autophagy in Zika Virus Transfer through the Placental Barrier. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. January, p. 1–6, 2017.

ZHU, S. et al. p38MAPK plays a critical role in induction of a pro-inflammatory phenotype of retinal Müller cells following Zika virus infection. **Antiviral Research**, v. 145, p. 70–81, 2017.